

Aus der Klinik für Ophthalmologie  
(Direktor: Prof. Dr. Roider)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**EINFLUSS TOLL-LIKE-REZEPTOR-3 STIMULIERTER  
RETINALER PIGMENTEPITHELZELLEN  
AUF DIE PHAGOZYTÖSEAKTIVITÄT  
RETINALER MIKROGLIAZELLEN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
**KAREN SCHLÜTER**  
aus **VECHTA**

Kiel **2017**

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Alexa Karina Klettner
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Gregor Kuhlenbäumer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den: 14.09.2017

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

## **Inhalt**

Abkürzungsverzeichnis .....	V
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Tabellenverzeichnis .....	IX
1. Einleitung .....	1
1.1. Altersbedingte Makuladegeneration .....	1
1.1.1. Formen der AMD .....	1
1.1.2. Pathogenese der AMD .....	2
1.1.3. Ätiologie der AMD .....	2
1.1.4. Therapie der AMD .....	4
1.2. Aufbau und Zellen der Retina .....	5
1.2.1. Photorezeptorzelle .....	6
1.2.2. RPE-Zelle .....	6
1.2.3. Mikrogliazelle .....	7
1.3. Ziel dieser Arbeit .....	11
2. Material und Methoden .....	12
2.1. Material .....	12
2.1.1. Geräte .....	12
2.1.2. Chemikalien .....	12
2.1.3. Antikörper .....	14
2.1.4. Lösungen .....	14
2.1.5. Verbrauchsmaterialien .....	15
2.2. Methoden .....	15
2.2.1. Herstellung der RPE-Zellkultur .....	15
2.2.2. Herstellung der Mikrogliazellkultur .....	17
2.2.3. Vorversuche zur Etablierung des mikroskopischen Phagozytoseassays .....	20
2.2.4. Hauptversuche .....	22
3. Ergebnisse .....	26

3.1.	Kultur der Mikrogliazelle .....	26
3.2.	Vorversuche zur Etablierung des Phagozytoseassays .....	27
3.3.	Hauptversuche .....	30
3.3.1.	Mikroskopischer Phagozytoseassay .....	30
3.3.2.	Fluorometrischer Phagozytoseassay .....	32
4.	Diskussion .....	33
4.1.	Kritische Diskussion der Methoden .....	34
4.2.	Einordnung der Ergebnisse in die Literatur .....	35
4.3.	Fazit .....	37
5.	Zusammenfassung .....	38
6.	Literaturverzeichnis .....	39
7.	Danksagung .....	50
8.	Lebenslauf .....	51
9.	Publikation/Kongressbeiträge .....	52

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	Willkürliche Einheit ( <i>arbitrary unit</i> )
bFGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>Albumin from Bovine Serum</i> )
BDNF	Vom Gehirn stammender neurotropher Faktor ( <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i> )
C	Komplementfaktor
CCL	Chemokinligand
CD	Unterscheidungsgruppe ( <i>Cluster of Differentiation</i> )
CNTF	Ziliärer neurotropher Faktor ( <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> )
CNV	Chorioidale Neovaskularisation
COX	Cyclooxygenase
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CSF	Koloniestimulierender Faktor ( <i>Colony Stimulating Factor</i> )
CX3CR	CX3C Chemokinrezeptor
DAMP	schaden-assoziierte molekulare Struktur ( <i>Damage-Associated Molecular Pattern</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose</i>
DNAse	Desoxyribonukleinase
DsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraazidsäuretetrasodiumhydratsalz

Fc.....	<i>Crytallisable Fragment</i>
FCS.....	Fetales Rinderserum ( <i>Bovine Serum Fetal</i> )
HCL.....	Salzsäure
HEPES.....	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperatiny]- ethansulfonat
HLA.....	Humanes Leukozytenantigen
IBA.....	Ionisiertes Kalzium- bindendes Adaptermolekül ( <i>Ionized Calcium-Binding Adapter Molecule</i> )
IFN.....	Interferon
IL.....	Interleukin
iNOS.....	Stickstoffmonoxid-Synthase, Isoform i
KOH.....	Kaliumlauge
LPS.....	Lipopolysaccharid
LRP.....	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein</i>
MAC.....	Makrophagenantigenkomplex
MHC.....	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
NaCl.....	Natriumchlorid
NF-κB.....	Kernfaktor kappa B ( <i>Nuclearfactor-kappa B</i> )
NGF.....	Nervenwachstumsfaktor ( <i>Nerve Growth Factor</i> )
NT3.....	Neurotrophin-3-Faktor ( <i>Neurotrophic Factor-3</i> )
OCT.....	Okuläre Kohärenztomografie
P2RY6.....	Pyrimidinerner Rezeptor
PAMP.....	pathogen-assoziierte molekulare Struktur ( <i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i> )
PBS.....	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PDT.....	Photodynamische Therapie

PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
Pe/St	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Poly I:C	Polyinosinsäure-Polycytidinsäuresodiumsalz ( <i>Polyinosinic Acid Polycytidylic Acid</i> )
ROS	Rezeptoraußensegment
RPE	Retinales Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>Rounds Per Minute</i> )
RT-PCR	<i>Real-Time</i> -Polymerase Kettenreaktion
SR	<i>Scavenger-Receptor</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor ( <i>Toll-like Receptor</i> )
TNF	Tumornekrosefaktor
T-TBS	Tween-TBS
VEGF	Vaskuloendothelialer Wachstumsfaktor ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
ZK	Zellkultur

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Funduskopiefotos einer AMD.....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Retina .....	5
Abbildung 3: Deaktivierte Mikrogliazellen in einer Schweineretina. ....	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der mikrogliaaktivierenden Faktoren. ....	9
Abbildung 5: Immunhistologische Makulafärbung eines AMD- Patienten.....	11
Abbildung 6: Mikrogliazellkulturflasche .....	18
Abbildung 7: Grafische Darstellung der Zellkulturtestplatte .....	23
Abbildung 8: Deckglaseinteilung (Kreis) in neun Quadranten .....	24
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Auswertungskriterien.....	24
Abbildung 10: Grafische Darstellung der Zellkulturtestplatte .....	25
Abbildung 11: Fotos und Auswertung der Iba-1 Färbung der Mikrogliazellen .....	27
Abbildung 12: Fotos der Beschichtungen mit Kollagen A oder Poly-L-Lysin.....	27
Abbildung 13: Fotos der Phagozytose von mit und ohne ROS opsonierten Latexkügelchen.....	28
Abbildung 14: Fotos der Phagozytose mit gereinigten und nicht gereinigten Latexkügelchen .....	28
Abbildung 15: Fotos und Ergebnisse der Phagozytose bei verschiedenen Konzentrationen von LPS .	29
Abbildung 16: Fotos der Phagozytose mit verschiedenen Konzentrationen von Latexkügelchen.....	30
Abbildung 17: Fotos der mikroskopischen Phagozytoseassays .....	31
Abbildung 18: Ergebnisse der mikroskopischen Phagozytoseassays.....	32
Abbildung 19: Ergebnisse der fluorometrischen Phagozytosessays. ....	33
Abbildung 20: Quantifizierungsprobleme beim mikroskopischen Phagozytosessay.....	34



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Auflistung der Geräte mit Angabe und Ort des Herstellers.....	12
Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien mit Angabe und Ort des Herstellers.....	14
Tabelle 3: Auflistung der Antikörper mit Angabe und Ort des Herstellers.....	14
Tabelle 4: Auflistung der Verbrauchsmaterialien mit Angabe und Ort des Herstellers.....	15

# **1. Einleitung**

## **1.1. Altersbedingte Makuladegeneration**

In Folge des demografischen Wandels steigt die Inzidenz der Altersbedingten Makuladegeneration (AMD) in unserer Gesellschaft drastisch an. Zum Erkrankungsbeginn wird von den Patienten keine größere Seheinschränkung bemerkt, die nicht mit einer vergrößernden Sehhilfe ausgeglichen werden kann. Doch es folgen grauschwarze Schatten im Zentrum des Blickfeldes, sogenannte Zentralskotome. Weiterhin kommt es zu Sehverlust oder auch zu einem Verzerrtsehen der Objekte, die fixiert werden (Metamorphopsie) [Grehn 2012]. Die in der Regel über 65-jährigen Patienten verlieren die Fähigkeit zur Gesichtererkennung, zum Lesen und zum Autofahren. Hierdurch kommt es zu einem dramatischen Verlust an Lebensqualität und zwar in einem vergleichbaren Ausmaß wie bei einem Schlaganfall [Chia et al. 2004]. Laut populationsbasierten Studien steigt die Prävalenz der AMD bei über 50-Jährigen in unserer Bevölkerung exponentiell an. 0,5-1 % der 60-Jährigen, 2 % der 70-Jährigen, 5 % der 80-Jährigen und bereits 10-15 % der 85-90-Jährigen weisen ein Spätstadium der AMD auf [Bressler et al. 1989, Klein et al. 1992, Leibowitz et al. 1980, Vingerling et al. 1995]. Durch den demografischen Wandel werden im Jahre 2020 bei kompletter Anwendung der neuen Behandlungsmethoden und Vitaminprophylaxen der AMD zusätzliche Kosten von 3,5 Milliarden Euro für unser Gesundheitssystem entstehen. 2050 wird sich dieser Betrag verdoppelt haben [Schrader 2006]. In den folgenden Abschnitten werden die Formen, die Ätiologie, die Pathogenese und die Therapiemöglichkeiten der AMD erläutert.

### **1.1.1. Formen der AMD**

Eingeteilt wird die AMD in zwei Formen: die nicht-exsudative (trockene) und die exsudative (feuchte) Form. Im Frühstadium bilden sich sogenannte Drusen, welche ebenfalls in der Funduskopie als kleine gelblichweiße Herde zu sehen sind und aus Ablagerungen hyalinem Materials bestehen. Bei der trockenen AMD kommt es zur Atrophie des retinalen Pigmentepithels (RPE), der Aderhaut und der Photorezeptorzellen, welche in der Funduskopie deutlich zu beobachten ist. Bei der feuchten AMD führen weiterhin chorioidale Neovaskularisationen (CNVs) aus der Aderhaut unter das RPE und in den subretinalen Raum zu Ödemen, Blutungen und Vernarbungen [Grehn 2012]. Die daraus entstehenden Metamorphopsien werden am deutlichsten beim Fixieren von Gitterlinien (Amsler-Test). Sowohl in der okulären Kohärenztomografie (OCT), einer nicht invasiven Schichtbildaufnahme der Retina, als auch in der Fluoreszenzangiografie, bei der die Gefäße und Flüssigkeitsaustritte mithilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes sichtbar gemacht werden, sind Atrophien, Neovaskularisationen und Ödeme zu beobachten. Das Zentralskotom in der Gesichtsfeldprüfung (Perimetrie) ist sowohl für die trockene als auch für die feuchte Form typisch [Grehn 2012].

Die seltenere feuchte AMD führt wesentlich schneller und ausgeprägter zur Sehbehinderung. Bei 10-20 % der Betroffenen wurde ein Übergang von der trockenen in die feuchte AMD beschrieben [Masche 2006]. Da diese Veränderungen in der Makula der Patienten geschehen, kommt es so zu einer schnell fortschreitenden Sehverschlechterung an der schärfsten Stelle des Sehens, dem Fixationspunkt.

### 1.1.2. Pathogenese der AMD

In der Funduskopie von AMD Patienten sind Drusen die ersten klinischen Auffälligkeiten (siehe Abb. 1 A). Weiterhin werden frühzeitig Pigmentverschiebungen beobachtet, welche durch das Zugrundegehen der RPE-Zellen entstehen [Grehn 2012]. Das Absterben des RPEs und die folgende chronische Aktivierung inflammatorischer Immunreaktionen führen zur fortschreitenden Atrophie von Choroidea und Retina (trockene AMD, siehe Abb. 1A) oder/und auch zur Freisetzung von proangiogenetischen Zytokinen wie dem *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). Durch ihn kommt es zur Bildung von CNVs: Gefäßschlingen aus der Choroidea wachsen durch Lücken in der Bruch'schen Membran unter das RPE (CNV Typ 1) oder auch unter die Retina (CNV Typ 2) [Kanski 2008]. Durch den minderwertigen Gefäßwandaufbau kommt es zu Blutungen, Lipidablagerungen und Ödemen, die wiederum eine Netzhautablösung hervorrufen können (feuchte AMD, siehe Abb.1B). In der Funduskopie werden so graubraune, runde Vorwölbungen sichtbar. Im Spätstadium bildet sich eine weißliche, fibröse Narbe mit im Kreis angeordneten Lipidexsudationen (Junius-Kuhnt Makulopathie) [Grehn 2012].

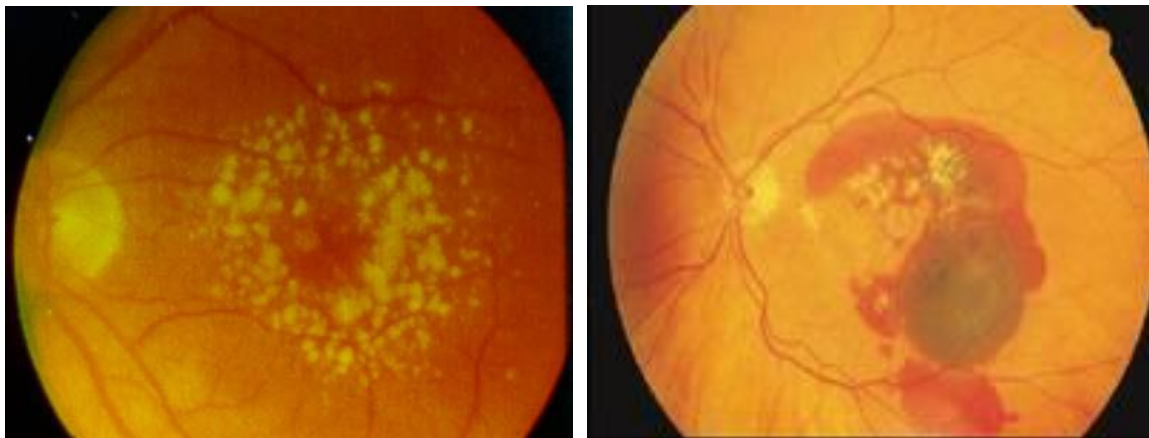


Abbildung 1: Funduskopiefotos einer AMD; A: Funduskopiefoto einer trockenen AMD, Drusen deutlich sichtbar; B: Funduskopiefoto einer feuchten AMD, Blutungen und Ödeme sind zu erkennen [Bilder entnommen aus den Archiven des Deutschen Grünen Kreuzes für Gesundheit 2006]

### 1.1.3. Ätiologie der AMD

Die AMD ist eine multifaktorielle Erkrankung. Das hohe Lebensalter, eine genetische Disposition und diverse Umweltfaktoren können über verschiedene Wege zu einem Gewebeschaden oder einer Dysregulation der Parainflammation der Makula führen:

#### a) hohes Lebensalter

Das hohe Lebensalter ist der mit Abstand wichtigste Risikofaktor der AMD. Durch Alterungsprozesse sind die Zellen einem vermehrten oxidativen Stress und gleichzeitig einer oxidativen Unterversorgung ausgesetzt: Die Photorezeptorzellen sind ihr Leben lang Licht und Sauerstoff ausgesetzt, was in der Kombination zu einer Bildung von freien Radikalen führt. Diese schädigen die Zellmembran der Rezeptoraußensegmente (ROS), machen eine kontinuierliche Zellerneuerung notwendig und führen vor allem im Alter durch eine verminderte RPE-Funktion [Hjelmeland et al. 1999, Boulton et al. 2001] zum Anhäufen von Stoffwechselendprodukten, welche letztendlich zur Zellschädigung führen können [Grehn 2012]. Die Expression von oxidierten Lipiden und Proteinen kann in der alternden Retina signifikant gemessen werden [Xu et al. 2009]. Gleichzeitig kommt es im Alter zu einer zunehmenden oxidativen Unterversorgung der Retina, bedingt durch die abnehmenden Dichte der Choroidekapillaris [Ramrattan et al. 1994] und die zunehmende Dicke der Bruch'schen Membran mit resultierender Reduzierung der Permeabilität [Ramrattan et al. 1994].

#### b) Genetische Disposition

In 25 % der Fälle tritt die AMD in einer Familie gehäuft auf [Seddon et al. 1997]. Auch in Zwillingsstudien zeigte sich, dass, wenn ein Zwilling an einer AMD erkrankte, die Wahrscheinlichkeit ebenfalls zu erkranken für einen monozygoten Zwilling doppelt so hoch war wie für einen dizygoten Zwilling [Meyers et al. 1995, Hammond et al. 2002]. Durch Genanalysen wurden bereits Variationen von Genen ausfindig gemacht, die mit der AMD in Verbindung stehen (Fibulin-6, VEGF und viele weitere) [Schultz et al. 2003, Conley et al. 2005, Haines et al. 2006].

#### c) Umweltfaktoren

Rauchen, Adipositas, Hypercholesterinämie, kardiovaskuläre Erkrankungen, eine starke Sonnenexposition und eine geringe Einnahme von Antioxidantien und Zink werden in der Literatur als Risikofaktoren erwähnt [Jager et al. 2008, Masche 2006].

#### d) (Para-)Inflammation

Als letzter wichtiger Faktor wird die (Para-)Inflammation bei der Entstehung der AMD angesehen [Ambati et al. 2013, Ding et al. 2009, Anderson et al. 2010]. Durch Alterungsprozesse entstehen Gewebeschäden (siehe Punkt 1.1.3 a)), die zu einer protektiven Antwort des adaptiven Immunsystems auf einem niedrigen Level führen. Diese Reaktion des Immunsystems wird als Parainflammation bezeichnet, einem Zustand zwischen Homöostase und Inflammation [Medzhitov 2008]. Das Ziel der Parainflammation ist es, die geschädigten Zellen zu heilen oder die Apoptose einzuleiten und so die Homöostase aufrecht zu erhalten. Die Parainflammation soll vor allem bei altersbedingten Erkrankungen wie auch der AMD eine Rolle spielen [Anderson et al.

2002, Ambati et al. 2013]. Am wahrscheinlichsten ist, dass es bei AMD-Patienten aufgrund von genetischer Disposition (siehe Punkt 1.1.3 b)) und Umweltfaktoren (siehe Punkt 1.1.3 c)) eine Dysregulation der Parainflammation stattfindet. Diese wird dadurch zu einer chronischen Inflammation, die in einen größeren Gewebeschaden endet [Chen et al. 2015]. Verschiedene Beobachtungen weisen auf diese Theorie hin:

1. Inflammatorische Moleküle wie Prothrombin, Vitronectin, Faktor X, Amyloid A/P, Immunglobuline, Humane Leukozytenantigene (HLAs) und Komplementproteine wurden als Bestandteile von Drusen identifiziert [Anderson et al. 2002]. Weiterhin soll der Kontakt zwischen aktivierten Mikrogliazellen und den fettreichen Außensegmenten der Photorezeptorzellen zu einer vermehrten intrazellulären Anreicherung von Lipiden führen. Es resultiert eine Umwandlung der Mikrogliazellen zu Schaumzellen, welche als Ursprung der Drusenbildung beschrieben wurden [Combadiere et al. 2007, Raoul et al. 2008].
2. Immunzellen, darunter Makrophagen und Mastzellen, konnten in Läsionen der AMD und der benachbarten Choroidea beobachtet werden [Penfold et al. 1985, Penfold et al. 1997].
3. Polymorphismen verschiedener Gene, die Faktoren oder Rezeptoren des Immunsystems betreffen wie Komplementfaktor H (CFH), Komplementfaktor 3 (C3), CX3C Chemokinrezeptor 1 (CX3CR1) und *Toll-like*-Rezeptoren 3 und 4 (TLR3/4), erhöhen das Risiko an einer AMD zu erkranken [Tuo et al. 2012]. Auf der anderen Seite entsteht in Tierversuchen ein AMD ähnlicher Phänotyp, wenn bestimmte Gene des Immunsystems verändert werden [Ambati et al. 2003, Combadiere et al. 2007, Chen M et al. 2013, Chen et al. 2011, Ufret-Vincenty et al. 2010].

#### **1.1.4. Therapie der AMD**

In einer Kohortenstudie wurde Antioxidantien wie Vitamin C und E, Betacarotin und Zink eine Risikoreduktion für eine AMD um 35 % nachgewiesen. Eine ausreichende Einnahme von Antioxidantien nützt so als Primärprävention. Eine zusätzliche Gabe von Antioxidantien wirkt als Sekundärprävention zur Verlangsamung des Fortschreitens der Erkrankung [Masche 2006].

Die intravitreale Injektionen von Angiogenese-Hemmern sind momentan die wichtigsten Behandlungsmöglichkeiten der exsudativen AMD. Diese Medikamente blockieren den VEGF, welcher zu Gefäßneubildungen führt und bei AMD-Patienten intraokular erhöht ist [Grehn 2012]. In Phase drei Studien mit Ranibizumab (Lucentis ®) zeigte sich bei 95 % der behandelten Patienten eine Stabilisierung der Sehleistung im ersten Jahr [Heier et al. 2006], wohingegen bei der Kontrollgruppe, die mit einer Scheininjektion oder einer Photodynamischen Therapie (PDT, siehe unten) behandelt wurden, die Sehleistung nur zu 62 % bzw. 64 % stabilisiert wurde [Heier et al. 2006, Brown et al. 2006]. Auch bei intravitrealen Injektionen von Bevacizumab (Avastin ®, off-label) zeigte sich eine Reduktion der subretinalen Flüssigkeit und eine Stabilisierung der Sehleistung [Rosenfeld et al. 2005]. Seit 2011 wurde zusätzlich noch Aflibercept (Eylea ®) für die Therapie zugelassen, welches sich in

der VIEW-Studie als genauso effektiv zeigte wie Ranibizumab [Heier et al. 2011]. Heute gelten die VEGF-Antagonisten als die wichtigsten Bestandteile der Behandlung der exsudativen AMD im klinischen Alltag.

Eine heute kaum noch bei der exsudativen AMD angewendete Therapie ist die Laserkoagulation. Mit ihr werden vor allem polyploidale CNVs verödet, wobei jede Anwendung zum Absterben von Photorezeptorzellen und somit zu einem Skotom führt. So ist sie heute nur noch bei weniger als 25 % der Patienten eine Option [Arnold 2005, Sun et al. 2005]. Auch die PDT wird nur noch selten bei der exsudativen AMD angewendet. Bei der Behandlung wird ein photosensibler Farbstoff intravenös infundiert und gelangt so in die Endothelien der CNVs. Durch eine Laserbehandlung werden freie Radikale und reaktive Sauerstoffmoleküle gebildet, die zu Endothelschäden und Gefäßverschlüssen führen. Diese Behandlung wird vor allem durchgeführt, wenn sich die Neovaskularisationen direkt unter der Fovea befinden [Grehn 2012].

## 1.2. Aufbau und Zellen der Retina

Die Retina ist entwicklungsgeschichtlich ein vorgeschobener Teil des Gehirns und somit ebenso wie dieses eine immunprivilegierte Zone. Sie besteht aus zehn Schichten [Lüllmann-Rauch 2009]. Der schematische Aufbau ist der Abbildung 2 zu entnehmen:

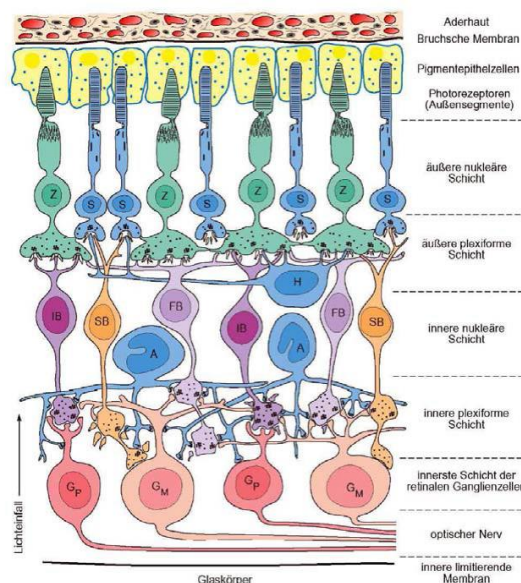


Abbildung 2: Schematisch Darstellung des Aufbaus einer Retina [Abb. entnommen aus Deetjen et al. 1994], oben: äußere Retinaschichten; unten: innere Retinaschichten; Z: Zapfen; S: Stäbchen; IB, SB, FB: Bipolarzelle; H: Horizontalzelle; A: amakrine Zelle; G: Ganglienzelle

In der Netzhautmitte, die aufgrund des Vorhandenseins eines gelben Pigments Macula lutea (= gelber Fleck) genannt wird, ist die Dichte an Photorezeptorzellen (v.a. Zapfenzellen) besonders hoch [Lüllman- Rauch 2009]. Hier ist der Ort des schärfsten Sehens und gleichzeitig Ort des Geschehens bei der AMD, die vor allem die RPE-Zellen und die Photorezeptorzellen betrifft.

### 1.2.1. Photorezeptorzelle

Die Perikaryen der Photorezeptorzellen befinden sich in der äußeren Körnerschicht. Es gibt zwei Arten von Photorezeptorzellen: die Zapfen für das Erkennen von Farben und die Stäbchen für das Unterscheiden von Helligkeit und Dunkelheit. Beide Zellarten besitzen Rezeptoraußensegmente (ROS), welche aus Zellmembranscheiben bestehen. Hier befindet sich das Sehpigment Rhodopsin und somit der Ort der photochemischen Reaktion. Bei dieser Reaktion wird ein Lichtreiz in eine Membranpotentialschwankung umgewandelt und als ein nervaler Impuls weitergeleitet [Lüllmann-Rauch 2009].

### 1.2.2. RPE-Zelle

Zwischen Aderhaut und Retina liegen die RPE-Zellen. Sie sind untereinander über Haftkomplexe (*Tight Junctions*) verbunden und bilden eine Blut-Retina-Schranke. Das RPE kontrolliert den Stoffaustausch zwischen Choroidea und der Retina [Lüllmann-Rauch 2009]. Die RPE-Zelle ist Teil eines komplexen Zellkommunikationssystems, welches Durchblutung, Permeabilität, Wachstum und Zellreparaturen kontrolliert. Dazu ist das RPE im Stande, verschiedene Wachstumsfaktoren zu sezernieren (z.B. *Platelet-derived growth factor* (PDGF), VEGF). Außerdem ist das RPE das wichtigste Gewebe für die Aufrechterhaltung der Funktion der Photorezeptorzellen [Zinn et al. 1979, Marmor et al. 1998]: Eine RPE-Zelle ist für ca. 45 Photorezeptorzellen verantwortlich. Während der Photonabsorption verändert ein Teil des Rhodosins seine Konformation und wird abgespalten. Die RPE-Zelle macht diesen Vorgang wieder rückgängig, sodass der Photorezeptorzelle neues Rhodopsin zur Verfügung steht. Sie besitzt demzufolge eine entscheidende Rolle in der Regeneration des Sehfärbstoffes und so eine Schlüsselfigur im Sehvorgang. Weiterhin müssen die ROS kontinuierlich erneuert werden. So werden täglich an die 100 Membranscheiben von dem distalen Ende eines ROS abgelöst und von einer RPE-Zelle phagozytiert. Am basalen Ende der ROS werden neue Membranen hergestellt, sodass ca. alle zwei Wochen ein komplettes Außensegment erneuert wird. Wichtige Fettsäuren werden dabei von der RPE-Zelle recycelt und für die Synthese neuer Scheiben zu den ROS zurücktransportiert. Abfallprodukte werden über die basale Membran wegtransportiert. Jede RPE-Zelle verarbeitet ca. 4000 Membranscheiben pro Tag [Marmor 2010, Lüllmann-Rauch 2009].

Nicht allein die Blut-Retina-Schranken und das Fehlen eines Lymphsystems machen die Retina zu einer immunprivilegierten Zone. Sie besitzt zusätzlich ein vom systemischen Immunsystem unabhängiges Abwehrsystem, bestehend aus den residenten Makrophagen, den Mikrogliazellen, und den RPE-Zellen, die eine Schlüsselstellung in der Immunregulierung und Immunabwehr einnehmen. Denn eine zu starke Aktivierung des Immunsystems in einem neuronalen Gewebe wie der Retina hätte neurodegenerative Auswirkungen. So exprimiert und sezerniert die RPE-Zelle verschiedene Immunmodulatoren, um die Aktivität der Abwehrzellen zu supprimieren: Sowohl über proinflammatorisches Interferon-gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) [Percopo et al. 1990, Sun et al. 2003], als auch über die Aktivierung des *Toll-like-Rezeptors-3* (TLR-3) [Chen S et al. 2013] werden die RPE-Zellen zur

Expression vom Haupthistokompatibilitätskomplex-II (MHC-II) angeregt. Die RPE-Zelle wird so zu einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC), die im Gegensatz zu den professionellen APC mit hoher MHC-II Expression eher inhibierende Einwirkungen auf T-Zellen hat. Zwar kann auch die RPE-Zelle der T-Zelle bakterielle Superantigene präsentieren und so eine Immunantwort auslösen [Jørgensen et al. 2001], jedoch verfügt sie auch über drei verschiedene Mechanismen, um die T-Zell-Aktivität und -Zellzahl zu reduzieren: Aktive T-Zellen können von den RPE-Zellen in die Apoptose getrieben und phagozytiert werden [Willermain et al. 2002]. Weiterhin sind die RPE-Zellen im Stande, die aktiven T-Zellen in einen anergischen Zustand zu versetzen, in dem sie zwar weiterhin Oberflächenmoleküle wie *Cluster of differentiation*- 96 und -25 (CD-69, CD-25) exprimieren, jedoch kein Interleukin-2, -17 (IL-2, IL-17) und IFN $\gamma$  sezernieren und nicht mehr proliferieren können [Gregerson et al. 2007]. Als letzte Möglichkeit können die RPE-Zellen die aktiven T-Zellen über den *Transforming Growth Factor*- $\beta$  (TGF $\beta$ ) in regulatorische T-Zellen umwandeln, welche wiederum die Aktivität anderer T-Zellen über IL-10 und TGF $\beta$  reduzieren [Sugita et al. 2006, Futagami et al. 2007]. Der Einfluss der RPE-Zellen auf die Mikrogliazellen wird im Kapitel 1.2.3.1 näher erläutert.

Doch die RPE-Zellen können, wenn es notwendig ist, auch eine lokale Immunantwort einleiten. Da das RPE eine Blut-Retina-Schranke bildet und somit als erstes mit pathogenen Erregern aus dem Blut in Kontakt kommt, sind die TLRs Bestandteile einer ersten Abwehrreaktion der Retina gegen pathogene Krankheitserreger. Sie erkennen Molekülbestandteile sogenannter pathogen-assoziiierter molekularer Strukturen (PAMPs) und induzieren eine Immunantwort [Medzhitov et al. 1997]. Durch eine Signalkaskade kommt es zur Aktivierung anderer Immunzellen und Freisetzung von Zytokinen. Doppeltsträngige RNA (dsRNA) ist eine PAMP einer viralen Infektion, da die meisten Viren während der Replikation dsRNA herstellen. In dieser Arbeit wird Polyinosinsäure-Polycytidinsäuresodiumsalz (Poly I:C) [Alexopoulou et al. 2001], eine doppelsträngige Ribonukleinsäure, verwendet, um den TLR-3 zu stimulieren, der von RPE-Zellen im höchsten Maße exprimiert wird [Klettner et al. 2013]. Dies führt in der Zelle zur *Nuclearfactor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) -Aktivierung und so zur Produktion von IFN- $\beta$ , IL-6, IL-8, VEGF und weiterer Faktoren [Klettner et al. 2013, Kumar et al. 2004]. Vor allem IL-6 und IL-8 können über eine Aktivierung von Immunzellen, zu denen auch die Mikrogliazellen gehören, eine Abwehrreaktion einleiten [Raivich et al. 1996, Streit et al. 2000, Hanisch 2002]. Weiterhin können die über TLR-3 stimulierten RPE-Zellen die Mikrogliazellen zu einer Zytokinexpression anregen (näheres unter Punkt 4.2).

### **1.2.3.Mikrogliazelle**

In der immunprivilegierten Retina fungieren die Mikrogliazellen im deaktivierten Zustand als Gliazellen und im aktivierten Zustand als die residenten Makrophagen des Immunsystems [Streit 2002].



### 1.2.3.1. Deaktivierter Zustand

Die Mikrogliazellen bilden im deaktivierten Zustand in der Retina ein Netzwerk aus potentiellen Immunzellen. Mit reich verzweigten Ausläufern durchspannen sie ihre Umgebung (siehe Abb. 3). Als eine Art Gliazelle sorgen sie für Homöostase, räumen metabolische Endprodukte auf, phagozytieren Zelltrümmer und halten so die Funktion der Neurone aufrecht [Nimmerjahn et al. 2005].

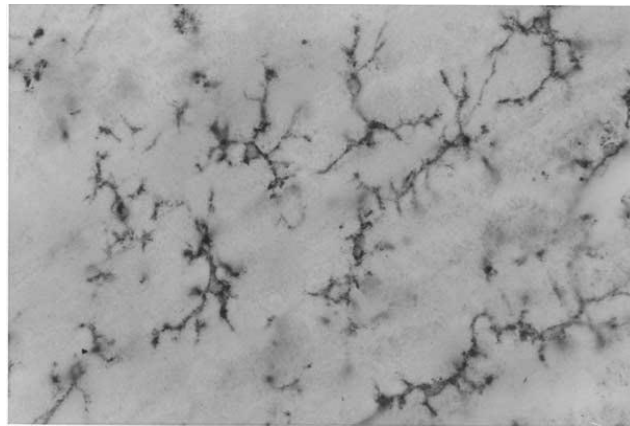


Abbildung 3: Deaktivierte Mikrogliazellen in einer Schweineretina, die mit einem Anti-CD45 monoklonalen Antikörper identifiziert und sichtbar gemacht wurden. Sie bilden ein verzweigtes Netzwerk [Abbildung aus Chen et al. 2002].

Für eine gesunde Retina sind deaktivierte Mikrogliazellen wichtig, denn diese produzieren den *Brain-Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), den *Nerve Growth Factor* (NGF), den *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), den *Neurotrophic Factor-3* (NT-3) und den *Fibroblast Growth Factor* (bFGF) [Carwile et al. 1998]. Diese Faktoren schützen und regulieren das Überleben retinaler Neurone einschließlich der Photorezeptorzellen. Sie werden nur produziert, wenn die Mikrogliazelle mit einer Müllerzelle (retinale Gliazelle) interagiert [Harada et al. 2003] (siehe Abb. 4). Damit die Mikrogliazellen im deaktivierten Zustand verbleiben, müssen weitere Bedingungen erfüllt sein (siehe Abb. 4):

Das RPE sezerniert durchgehend Tumornekrosefaktor- $\beta$  (TNF- $\beta$ ). Dieser führt zusammen mit dem antiinflammatorischen IL-10 zu einer Reduktion des antigenpräsentierenden MHC-II und der T-Zell aktivierenden Moleküle CD-80 und CD-86 [D’Orazio et al. 1998]. Zusätzlich wird die Expression von inflammatorischen Genen bei Mikrogliazellen blockiert, die durch TNF- $\gamma$  und IFN- $\gamma$  stimuliert wurde [Paglinawan et al. 2003].

Das Glykoprotein CD-200 auf Neuronen wird vom CD-200-Rezeptor auf Mikrogliazellen gebunden und hält den deaktivierten Zustand der Mikrogliazelle aufrecht [Nathan et al. 2001, Clark et al. 1985, McCaughan et al. 1987, Hoek et al. 2000, Wright et al. 2000]. Zusätzlich produzieren die Neurone durchgehend das Chemokin Fraktalkin [van Rossum et al. 2004], welches vom Fraktalkinrezeptor auf Mikrogliazellen gebunden wird und die Homöostase der Mikrogliazelle aufrechterhält [Cardona et al. 2006]. Ein purinerger Rezeptor auf den ruhenden Mikrogliazellen misst die Menge an Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP). Ein Ansteigen von ADP und ATP ist ein Zeichen von Neuronenschädigung und führt zur Aktivierung [Haynes et al. 2006].

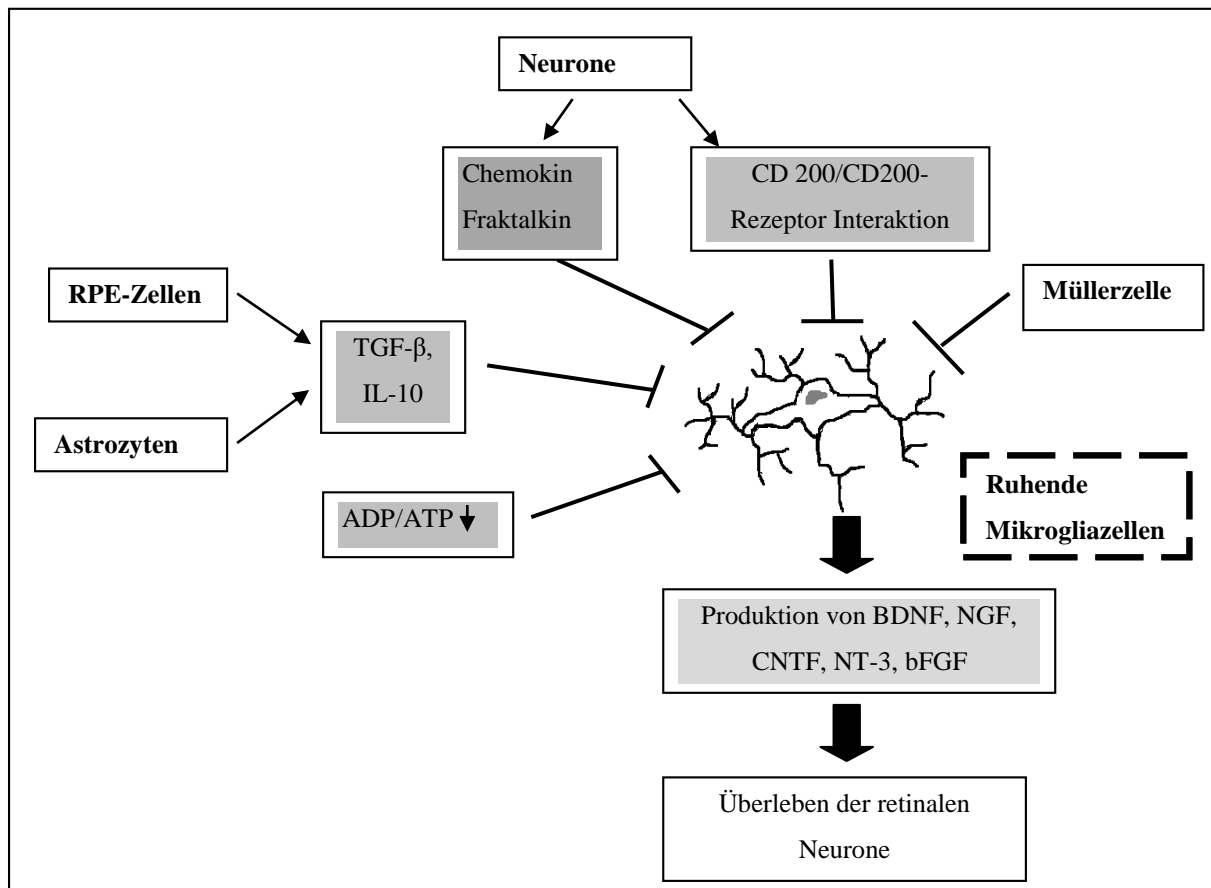


Abbildung 4: Schematische Darstellung der mikrogliaaktivierenden Faktoren. Nur unter diesen Bedingungen und durch Interaktion mit einer Müllerzelle produziert die Mikrogliazelle dBDNF, NGF, CNTF, NT-3 und bFGF. Diese Faktoren sichern das Überleben der retinalen Neurone.

#### 1.2.3.2. Aktivierter Zustand

Werden die Mikrogliazellen aktiviert, verändern sie ihre Form zu amöboiden Zellen. Nun bekommt die Mikrogliazelle die Eigenschaften eines Makrophagen. In diesem Zustand phagozytiert sie verstärkt pathogene Erreger oder Zellbruchstücke nekrotischer Zellen [Streit 2002]. Die Mikrogliazelle trägt auf ihrer Oberfläche die TLR 1-9 [Collin et al. 2013]. Diese erkennen sowohl PAMPs als auch schaden-assoziiierter molekularer Strukturen (DAMPs), die bei Zellnekrose freigesetzt werden [Streit et al. 2002, van Rossum et al. 2004, Nathan et al. 2001, Hanisch 2002]. So bindet TLR-2 Oberflächenmoleküle grampositiver Bakterien, TLR-3 erkennt dsRNA (wie z.B. Poly I:C (siehe Punkt 1.2.2.)) und TLR-4 erkennt Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil gramnegativer bakterieller Zellmembranen [Alexopoulou et al. 2001, Campos et al. 2001, Johnson et al. 2002, Opitz et al. 2001]. LPS gilt als einer der stärksten Aktivatoren von Mikrogliazellen [Schuetz et al. 2004]. Aufgrund dessen wurde LPS in dieser Arbeit zur Ermittlung des Maximalwertes der Aktivität der Mikrogliaphagozytose verwendet.

Doch auch der *Crystallisable-Fragment-Rezeptor* (Fc-Rezeptor), die Komplementrezeptoren [Veerhuis et al. 2011], der *Scavenger-Rezeptor* (SR), der Pyrimidinerge Rezeptor P2Y (G-Protein

gekoppelt, 6, (P2RY6)), der Makrophagenantigenkomplex-2 (MAC-2), der Mannoserezeptor [Lucin et al. 2009] und das *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1* (LRP-1) [Smith 1999] sind an der Phagozytoseaktivität der Mikrogliazelle beteiligt.

#### **1.2.3.3. Ionisierte Kalziumbindende Adaptermolekül-1 (Iba-1)**

Das Ionisierte Kalziumbindende Adaptermolekül-1 (Iba-1) ist ein kalziumbindendes Protein, welches sich im zentralen Nervensystem auf Mikrogliazellen befindet [Ito et al. 1998]. Iba-1 reguliert den Auf-, Ab- und Umbau des Aktinzytoskeletts in der Mikrogliazelle und beeinflusst somit die Proliferation, die Migration und die Phagozytose [Imai et al. 2002]. In dieser Arbeit wird Iba-1 verwendet, um die Mikrogliazellen in der Kultur mithilfe eines Iba-1-Antikörpers als solche zu identifizieren [Ito et al. 1998].

#### **1.2.3.4. Rolle der Mikrogliazelle bei der AMD**

Eine verstärkte oder länger anhaltende Mikrogliaaktivierung im ZNS oder der Retina führt zur chronischen Inflammation und zum Untergang neuronaler Zellen (Photorezeptorzellen) [Schuetz 2004, Hanisch 2007, Langmann 2007]. Es wurde beobachtet, dass mit steigendem Alter die Mikrogliazellen von der inneren Retina in den subretinalen Raum migrieren: Bei der Laserophthalmoskopie vom Fundus und bei der konfokalen Mikroskopie von 18 Monaten alten Mäusen konnten subretinal viele Mikrogliazellen nachgewiesen werden, die in ihren Zytoplasmata autofluoreszierende Lipofuscingranula enthielten [Xu et al. 2008]. Lipofuscin ist ein Abfallprodukt der Retina, welches in der Bildung von Drusen, bei der Atrophie vom RPE und bei der Entstehung einer AMD verwickelt sein soll [Sparrow et al. 2005]. Eventuell migrierten die Mikrogliazellen in den subretinalen Raum, um das RPE bei der Beseitigung von altersbedingten Ablagerungen zu unterstützen. Doch könnte die Nähe der aktivierten Mikrogliazellen die RPE-Zellen auch dazu beeinflussen, Faktoren freizusetzen, die weitere Mikrogliazellen anlocken und aktivieren [Xu et al. 2009]. Diese würde zu einer chronischen Inflammation führen.

Bei der Untersuchung der Makulae von AMD-Patienten wurden eine Vielzahl von großen amöboiden Mikrogliazellen in der Retina aber auch subretinal gefunden (siehe Abb. 5) [Gupta et al. 2003]. Normalerweise ist die Mikrogliazelle in der Retina in der inneren und äußeren plexiformen Schicht lokalisiert. Doch bei der immunhistologischen Färbung nach Gupta et al. war auffällig, dass die Zellen in die äußeren Schichten der Retina immigrierten. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Zellen eine hohe Phagozytoseaktivität aufwiesen. Sie enthielten Phagosomen mit rhodopsinhaltigen Partikeln, ein Sehpigment, welches nur in den Stäbchen der Retina vorkommt. Zusammenfassend konnte also beobachtet werden, dass die Mikrogliazellen bei der AMD ihren normalen Aufenthaltsort verlassen, in die äußere Körnerschicht wandern und eine hohe Phagozytoserate von Bestandteilen von Photorezeptorzellen besitzen. Dies könnte eventuell ein Zeichen dafür sein, dass die Phagozytose neurotoxische Auswirkungen haben kann und an Degenerationsprozessen der AMD beteiligt ist.

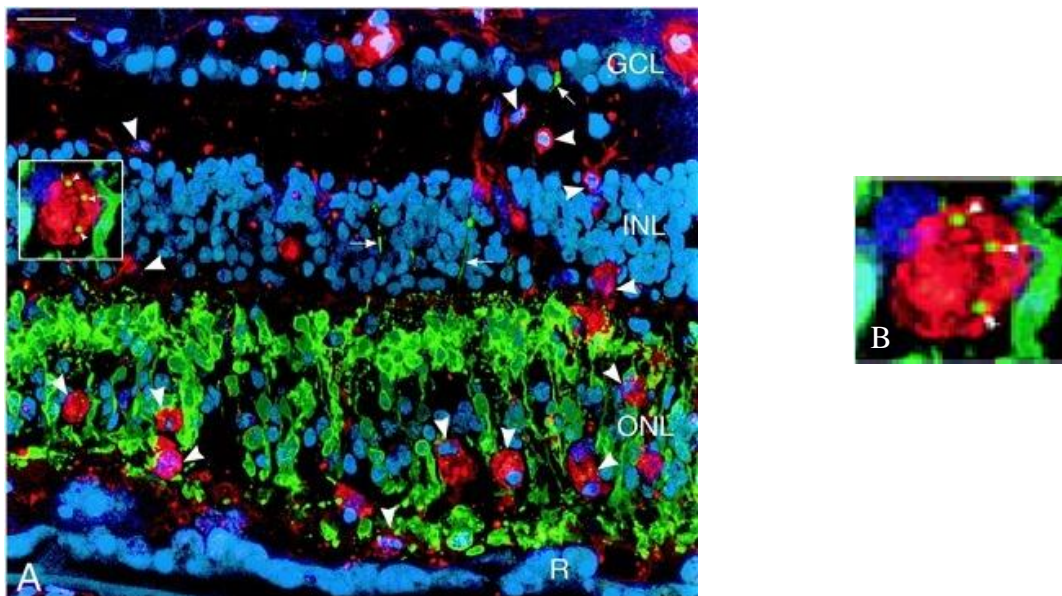


Abbildung 5: Immunhistologische Makulafärbung eines AMD- Patienten. A: Die Stäbchenzellen wurden mit einem Anti-Rhodopsin-Antikörper grün und die Mikrogliazellen mit Ricinus communis agglutinin rot gefärbt. Zellkerne wurden mit To-Pro-3 blau gefärbt. R: RPE, ONL: äußere Körnerschicht, INL: innere Körnerschicht, GCL: Ganglienzellschicht;

Zusätzlich konnten im Serum von AMD-Patienten Antikörper gegen retinale Bestandteile gefunden werden [Gu et al. 2003, Patel et al. 2005]. Diese können nur bei Kontakt von Lymphozyten des Immunsystems mit retinalen Antigenen entstanden sein. Da die Retina eine immunprivilegierte Zone ist, entstand die Theorie, dass die sich subretinal befindenden Mikrogliazellen die Retina über Blutgefäße verlassen [Raoul et al. 2008] und als APC in der Milz eine Antwort des angeborenen Immunsystems hervorrufen [Gu et al. 2003, Patel et al. 2005].

### 1.3. Ziel dieser Arbeit

In der immunprivilegierten Retina sind die Mikrogliazellen als Makrophagen des Immunsystems sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen beteiligt. Auch ein minimales Ungleichgewicht in ihrer Aktivierung kann zum Untergang neuronaler Zellen führen. Wie dieses Ungleichgewicht entsteht, ist noch nicht vollständig geklärt. Dass TLR-3 stimulierte RPE-Zellen die Mikrogliazellen zu einer Zytokinexpression wie IL-6 und IL-8 anregen, konnte bereits gezeigt werden (siehe Punkt 4.2) [Klettner et al. 2014], wohingegen der Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen noch wenig erforscht ist. Ziel dieser Arbeit war es, a) einen Phagozytoseassay für diese Fragestellung zu etablieren und b) den Einfluss von TLR-3 aktivierten RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität von retinalen Mikrogliazellen zu untersuchen. Diese Ergebnisse könnten Hinweise darauf geben, ob ein solcher Einfluss an dem degenerativen Geschehen während einer AMD beteiligt ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller, Ort des Herstellers</i>
Autoklav (Varioklar)	H+P, Oberschleißheim
Brutschrank	Labotect, Göttingen
Elisa-Reader	BioTek, Bad Friedrichshall
Fluoreszenzreader ( <i>Fluoroscans Ascent</i> )	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Mikroskop (Axiovert 100)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop (Axiovert 200 M)	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrowelle ( <i>Gourmet Wave</i> )	Gorenje Vertriebs GmbH, München
Pinzette (BD 314)	Aesculap AG, Tuttlingen
Pipetten (Research)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettus (Easypet)	Eppendorf AG, Hamburg
Saugpumpe (Vacusafe Comfor)	Integra Biosciences AG, Fernwald
Schüttler (Vortexer)	Eydam, Kiel
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Waage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Zellkulturwerkbank Antair BS	A. Sternkopf GmbH, Lübeck
Zentrifuge (Sorvall ST 40)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zentrifuge (Centrifuge 5414)	Eppendorf AG, Hamburg

*Tabelle 1: Auflistung der Geräte mit Angabe und Ort des Herstellers.*

#### 2.1.2. Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Hersteller, Ort des Herstellers</i>
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperatiny]-ethansulfonat (HEPES)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Aceton, 100 %	Merck KGaA, Darmstadt
Aqua bidest (Ampuwa Spüllösung)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe
Betaisodonna	Mundipharma GmbH & Co. KG, Limburg/Lahn
Desoxyribonukleasenase (DNase) vom	Hoffmann – La Roche, Grenzach-Wyhlen

Rinderpankreas (Konz.: 10 mg/ml)	
<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) High Glucose</i> (4,5 g/L mit L-Glutamin)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Eindeckmedium ( <i>Immuno Mount</i> )	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Eindeckmedium ( <i>Slowfade</i> )	Invitrogen, Darmstadt
Ethanol (99 %, vergällt mit Petrolether)	Büfa Chemikalien GmbH & Co. KG, Lübeck
Ethylendiamintetraazidsäure Tetrasodiumhydratsalz (EDTA)	Sigma- Aldrich, München
Fetales Rinderserum (FCS)	Linaris GmbH, Dossenheim
Höchstfarbstoff (Bisbenzimid H) 10 µg/ml	Sigma- Aldrich, München
Kaliumlauge 5 % (KOH)	Rudolf Walter GmbH & Co KG Broderstorf
Kollagen A, 0,1 % in Salzsäure, 1 mg/ml	Biochrom GmbH, Berlin
Latexkügelchen (Amin modifiziertes Polystyrol, gelbe Fluoreszenz, 1 µm Durchmesser, 2,5 %)	Sigma-Aldrich, München
Lipopolysaccharid (LPS), 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium- Azid (Na-Azid)	Riedel del Haen, Seelze
Natriumchlorid 0,9 % (NaCl)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe
Natriumchlorid	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Natriumdihydrogencarbonat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat-Monohydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Nicht-essentielle Aminosäuren	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Paraformaldehyd (PFA), reinst	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin 10 000 µg/ml (Pe/St)	Biochrom GmbH, Berlin
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Pikrinsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Poly I:C, 10 mg/ml	Calbiochem Novabiochem GmbH, Sandhausen
Poly-L-Lysin, 0,01 %	Sigma- Aldrich, München
Puffersubstanz, <i>Dulbecco`s</i> Pulver	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Rinderserumalbumin (BSA)	Fluka Chemie AG, Buchs (Schweiz)
Salzsäure 25 % (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sodium Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Sucrose, 34 %	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trizma Base (Tris)	Sigma- Aldrich, München
Trypanblau 0,5 %	Biochrom GmbH, Berlin
Trypsin vom Schweinepankreas	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypsin-EDTA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt

*Tabelle 2: Auflistung der Chemikalien mit Angabe und Ort des Herstellers.*

### 2.1.3. Antikörper

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller, Ort des Herstellers</i>
Alexa Flour A31628 vom Kaninchen 2 mg/ml	Invitrogen AG, Darmstadt
Ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül (Iba-1) Polyklonal vom Kaninchen 50 µg/µl	Wako Chemicals GmbH, Neuss

*Tabelle 3: Auflistung der Antikörper mit Angabe und Ort des Herstellers.*

### 2.1.4. Lösungen

10 x Tris gepufferte Kochsalzlösung (TBS): 1 mol Trizma Base und 1,5 mol Natriumchlorid in 600 ml Aqua bidest; mit 25 % HCL den pH auf 7,5 einstellen, mit Aqua bidest auf 1 L auffüllen

Dissoziationslösung: 0,1 mmol Hepes, 7 µmol EDTA und 0,43 µmol Trypsin in 10 ml *DMEM High Glucose*

Homogenisierungsmedium: 65 mmol NaCl, 2 mmol MgCl<sub>2</sub> und 5 mmol Hepes in 34 % iger Sucrose

Mikrogliaedium: 10 % FCS (aktiv) und 1 % Pe/St in *DMEM High Glucose*

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS): 137 mmol NaCl, 2,7 mmol KCl und 12 mmol Gesamt-Phosphat in Aqua bidest.

PBS Azid: 0,77 mmol Na-Azid in 50 ml PBS

PBS mit Pe/St: 10 % PBS und 1 % Pe/St in Aqua bidest.

Stimuliermedium: 1 % nicht-essentielle Aminosäuren und 1 % Pe/St in *DMEM High Glucose*

Trypsin-EDTA: 2,15 µmol Trypsin und 70 µmol EDTA in 100 ml PBS

Trypsinlösung: 10,73 µmol Trypsin in 100 ml PBS

Tween-TBS (T-TBS): 0,11 % Tween und 11,1 % 10 x TBS in TBS

Phosphatpuffer: 11,7 mmol Natriumdihydrogencarbonat-Monohydrat und 133,3 mmol Natriumhydrogencarbonat-Monohydrat in 500 ml Aqua bidest.



Zambonie: 266,4 mmol PFA und 35 ml gesättigte Pikrinsäure in 165 ml Phosphatpuffer

Zellkulturmedium (ZK): 5 % FCS (aktiv), 0,55 % Sodium Pyruvat, 1,25 % HEPES und 0,5 % Pe/St in DMEM High Glucose mit Phenolrot

### 2.1.5. Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterial</i>	<i>Hersteller, Ort des Herstellers</i>
Deckglas	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Eppendorfröhrchen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Falconröhrchen	Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg
Kanüle ( <i>Microlance 3</i> )	Becton, Dickinson and Company (BD), Heidelberg
Kulturflaschen ( <i>Tissue Culture Flash</i> , 75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim vor der Röhn
Pasteurpipetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen (1000 µl, 100 µl, 10 µl, Typ: Eppendorf/Gilson)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Röhrchen (15 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml), <i>Research</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Spritze (Injekt 10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter (Nalgene Syringe 0,2 µm)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zellkulturschale ( <i>Nunclon Surface</i> )	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellkulturtestplatte (6 Well, farblos)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturtestplatte (12 Well, farblos)	Biochrom GmbH, Berlin
Zellkulturtestplatte (96 Well, schwarz)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

*Tabelle 4: Auflistung der Verbrauchsmaterialien mit Angabe und Ort des Herstellers.*

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Herstellung der RPE-Zellkultur

#### I. *Präparation von RPE-Zellen aus Schweineaugen mit Gewinnung der Retina für die Mikrogliazellkultur*

Die Präparation wurde nach Wiencke et al. 2003 mit einigen Veränderungen durchgeführt. Die von einer Schlachtereie gelieferten Schweineaugen wurden gekühlt aufbewahrt. Zunächst wurden die Augen mithilfe einer Schere und einer Pinzette von Muskel- und Bindegewebe befreit. Danach wurden diese für ca. fünf bis zehn Minuten in gekühlte Betailsodonalösung, welche 1:3 mit Natriumchloridlösung



(NaCl-Lösung) verdünnt wurde, und für 75 Minuten in gekühlter 0,9 %iger NaCl-Lösung gegeben. Unter sterilen Bedingungen wurden die Augen mit einer Rasierklinge auf Höhe der Pars plana geteilt. Der Augenvordergrund und der Glaskörper wurden verworfen. Mit warmer, steriler Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS), angesetzt mit Penicillin/Streptomycin (Pe/St), wurden die Augenschalen aufgefüllt. Umgehend wurde die Retina entfernt, indem mit einer Pinzette am Rand des Augenschälchens entlangfahren wurde. Die nun abgelösten Retinae wurden bis zur Mikrogliapräparation gekühlt in PBS aufbewahrt. Aus den Augenschalen wurde das PBS + Pe/St wieder herauspipettiert, woraufhin sie in einer Glasschale mit geschlossenem Deckel aufbewahrt wurden. Nach Entnahme der Retinae aus allen Augenschalen, wurde Trypsinlösung in diese gegeben. Nach zehn Minuten Inkubation bei 37 °C wurde das Trypsin abgenommen, durch Trypsin-Ethylendiamintetraazidsäuretetrasodiumhydratsalz (Trypsin-EDTA) ersetzt und bei 37 °C für 45 Minuten mit Deckel inkubiert. Danach wurde der Inhalt der Augenschälchen so lange resuspendiert bis sich die Lösung durch die abgelösten RPE-Zellen dunkel färbte. Diese Lösung wurde in ein Falconröhrchen mit 20 ml Zellkulturmedium (ZK-Medium) gegeben und bei 800 Umdrehungen pro Minute (rpm) für sieben Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde erneut 20 ml ZK-Medium hinzugeben und zentrifugiert. Das auf dem Boden des Röhrchens angesammelte Pellet wurde in 6 ml ZK-Medium resuspendiert und in zwei große Zellkulturschalen (60 mm Durchmesser) aufgeteilt. Die Zellen wurden im Wärmeschrank bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO<sub>2</sub>) und pH von 7,4 aufbewahrt [Wiencke et al. 2003].

## ***II. Mediumwechsel in der RPE-Zellkultur***

Zweimal wöchentlich wurde bei der RPE-Zellkultur das Medium gewechselt. Hierzu wurde die Flüssigkeit aus den Zellkulturschalen abgesaugt und diese wieder mit 3 ml warmen ZK-Medium aufgefüllt.

## ***III. Vermehrung der RPE-Zellen***

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 vermehrt. Dafür wurde das Medium aus den Kulturschalen abgesaugt und die Schalen mit PBS gewaschen. Nachdem in jede Schale 1 ml Accutase pipettiert wurde, folgte eine Inkubation von fünf bis zehn Minuten bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4. Wenn sich die Zellen durch die Accutase vom Boden ablösten, wurde in jede Schale 2 ml ZK-Medium gegeben. Durch vorsichtiges Abspülen wurden die Zellen vom Boden gelöst und die Zellsuspensionen in einem Falconröhrchen gesammelt. Bei 900 rpm wurde das Suspensat für fünf Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml ZK-Medium aufgelöst. Zusätzlich wurde 1 ml ZK-Medium pro Zellkulturschale zu der Zellsuspension dazugegeben. Am Ende wurde jeweils 1 ml dieser Zellsuspension in jede Schale pipettiert. Bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 wurden die Zellen aufbewahrt.

### **2.2.2. Herstellung der Mikrogliazellkultur**

Die Etablierung einer Mikrogliazellkultur erfolgte auf der Grundlage der Arbeit von Richardson et al. von 1993, welche für retinale Mikrogliazellen optimiert wurde [Klettner et al. 2014]. In den Zellkulturflaschen bildete sich auf dem Boden eine Schicht aus Astrozytenzellen und Mikrogliazellen. Lösten sich die Mikrogliazellen vom Boden, gingen sie in Lösung und konnten geerntet werden (siehe Abb. 6).

#### ***I. Dissoziation***

Die aus Punkt 2.2.1 I gewonnenen Retinae wurden mitsamt dem PBS in eine große Petrischale umgefüllt. Aus dieser wurden immer zwei Retinae in je eine kleine Petrischale mit 5 ml PBS Inhalt überführt. Durch ein Skalpell wurden die Retinae in ca. zweimal zwei Millimeter große Stücke zerkleinert. Unter Vermeidung von Blasenbildung wurden die zerstückelten Retinae mit dem PBS in jeweils ein Röhrchen pro Petrischale pipettiert. Der Überstand wurde abgesaugt und pro Röhrchen 3 ml Dissoziationslösung und 35 µl Desoxyribonuklease (DNase) dazugegeben. Um eine optimale Verteilung zu gewährleisten, wurden die Röhrchen unter Vermeidung von Blasenbildung geschwenkt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 wurde der Überstand abgesaugt. Pro Röhrchen wurden 2 ml erwärmtes Mikrogliaedium und 50 µl erwärmte DNase hineingegeben. Nun wurde der Inhalt mit einer serologischen Pipette dissoziiert, indem das Gemisch 4-5-mal auf- und abgesogen wurde. Das Gleiche geschah 2-3-mal mit einer Kanülenspritze, wobei Blasenbildung erneut vermieden wurde. Am Ende wurden die Gemische in einem 50 ml Röhrchen gesammelt.

#### ***II. Bebrütung***

Pro Zellkulturflasche waren zwei Retinae vorgesehen. In die Flaschen wurde jeweils 8 ml erwärmtes (37 °C) Mikrogliaedium gegeben. Das 50 ml Falconröhrchen wurde mit erwärmtem Mikrogliaedium aufgefüllt, sodass am Ende 5 ml der dissoziierten Retinae in jede Kulturflasche gefüllt werden konnten. Die Zellkulturflaschen mit den Mikrogliazellen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 bebrütet.

#### ***III. Mediumwechsel in der Mikrogliazellkultur***

In der ersten Woche nach Erstbebrütung musste das Medium am dritten und vierten Tag, in der zweiten Woche am siebten und elften Tag gewechselt werden. Ab der dritten Woche wurde das Medium zweimal pro Woche gewechselt. Dazu wurde der Inhalt ohne Berührung des Flaschenhalses und des Flaschenbodens abgesaugt. Dann wurde 14 ml erwärmten (37 °C) Mikrogliaedium in die Zellkulturflaschen gegeben. Die Zellkulturflaschen mit den Mikrogliazellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 bebrütet.

#### IV. Ernte der Mikrogliazellen

Für die Ernte wurden Kulturen verwendet, die mindestens zwei Wochen alt waren. Auf dem Boden der Kulturflaschen entstand eine Schicht aus Astrozytenzellen und Mikrogliazellen. Im Mikrogliaedium befanden sich die Mikrogliazellen, die sich vom Boden abgelöst hatten (Abb. 6). Um die benötigte Anzahl an abgelösten Mikrogliazellen ernten zu können, sollte der letzte Mediumwechsel mindestens zwei bis drei Tagen zurückliegen.

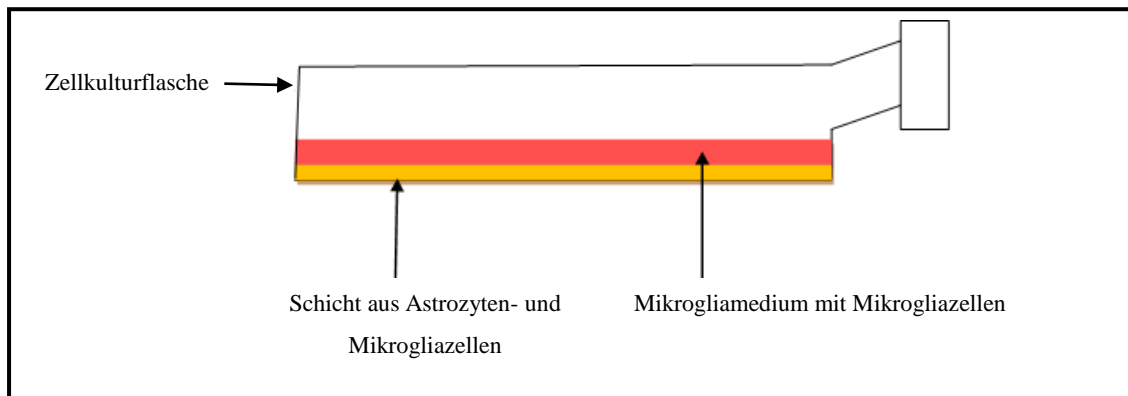


Abbildung 6: Mikrogliazellkulturflasche. In der Kulturflasche bildete sich eine Schicht aus Astrozytenzellen und Mikrogliazellen (gelb). Darüber befand sich das Medium mit den Mikrogliazellen (rot). Wurde das Medium mit den Mikrogliazellen abgeerntet und die Flasche mit neuem Mikrogliaedium gefüllt, so dauerte es ca. zwei bis drei Tage bis sich wieder neue Mikrogliazellen vom Boden abgelöst hatten.

Für die Ernte wurden die Kulturflaschen horizontal gehalten und sechsmal zu jeder Seite geschwenkt. Dann wurde der Inhalt in ein 50 ml Falconröhrchen umgefüllt. Die leere Kulturflasche wurde erneut mit 14 ml erwärmten Mikrogliaedium gefüllt und weiter inkubiert. Nach abgeschlossener Ernte wurden die Zentrifugenröhrchen für fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgesaugt, wobei in jedem Röhrchen ein Rest von ca. 2 ml Medium bleiben sollte. Der Inhalt jedes Falconröhrchen wurde resuspendiert, damit sich das Pellet auflöste. Das Resuspensat aller Röhrchen wurde in einem Röhrchen gesammelt. Nachdem dieses erneut für fünf Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert wurde, konnte der Überstand abgesaugt werden. Je nach folgendem Versuch wurde eine entsprechende Menge an Mikrogliaedium hinzugefügt. Dann folgte die Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauerzählkammer. Hierzu wurde das Resuspensat mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 vermischt, wovon 20 µl auf die Neubauerzählkammer gegeben wurde. Mit einem Axiovert 100 Mikroskop wurde die Anzahl der Zellen in den vier Großquadranten gezählt. Dieser Wert wurde durch vier dividiert und mit 10.000 multipliziert. Die Gesamtzellzahl erhielt man durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor.

#### V. Mikrogliazellnachweis mit dem Iba-1-Antikörper

##### a) Inkubation der Zellen auf einer 6-Well Platte

Die nach Punkt 2.2.2 IV. geernteten und gezählten Zellen befanden sich am Ende in einem Volumen von 0,7 ml. In eine 6-Well Platte wurde unter sterilen Bedingungen pro Well ein entfettetes Deckglas

gegeben. Auf diese Deckgläser wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension pipettiert und die Well Platte wurde dann bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 inkubiert. Nach einer halben Stunde wurde zu jeder Well 1 ml aufgewärmtes (37 °C) Mikrogliaedium gegeben, ohne die Zellen vom Deckglas herunterzuspülen. Jetzt musste die Platte für 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 inkubiert werden.

*b) Fixierung und Blockierung*

Nach 24 Stunden wurden die Wells einmal mit PBS gespült. Es folgte eine 30-minütige Fixierung mit der Fixierlösung Zambonie. Nach dreimaligen Spülen mit PBS wurde zehn Minuten lang mit Aceton nachfixiert. Erneut wurde dreimal mit PBS gespült. Darauf folgte die Blockierung mit 0,75 %igen Rinderserumalbumin (BSA) für 30 Minuten.

*c) Zugabe des Antikörpers Iba-1 und des Fluoreszenzantikörpers*

Nach Ablauf der Zeit wurde das BSA in drei von sechs Wells abgesaugt. Der Iba-1-Antikörper wurde mit 0,75 % BSA auf 1 µg/ml verdünnt, wovon 200 µl in die leeren Wells auf die Deckgläser geträufelt wurde. Nach 60 Minuten wurden alle Wells dreimal mit PBS gespült, wobei der letzte Spülpuffer stehen gelassen wurde. Der zweite fluoreszierende Antikörper band an den Fc-Teil des ersten Antikörpers Iba-1. Hierzu wurde dieser mit 0,75 % BSA auf 1 µg/350 µl verdünnt. Jeweils 100 µl hiervon wurden lichtgeschützt in jedes Well auf das Deckglas gegeben. Die Wells, die nur mit dem fluoreszierenden Antikörper inkubiert wurden, dienten hierbei als Negativkontrolle.

*d) Kernfärbung und Eindeckelung*

Nach 60 Minuten wurde dreimal mit PBS gespült. Für fünf Minuten folgte die Kernfärbung in allen Wells mit dem Höchstfarbstoff Bisbenzimid H. Erneut wurde dreimal mit PBS und einmal mit Aqua dest. gespült. Dann erfolgte das Eindecken auf Objektträger mit dem Eindeckmedium *Immuno Mount*.

*e) Auswertung Fluoreszenzfärbung Iba-1*

Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dazu wurde die Fluoreszenzeigenschaft der mit Iba-1 markierten Zellkerne mit den unmarkierten Zellkernen verglichen. Von jedem Objektträger wurden neun Fotos aufgenommen (siehe Abbildung 11 unter Punkt 3.1.) Von der Gesamtzellkernzahl auf einem Foto wurde der Anteil der fluoreszierenden Zellkerne prozentual ermittelt. Mit den insgesamt neun Fotos pro Well wurde der Mittelwert und die Standardabweichung pro Versuch (siehe Abbildung 11 unter Punkt 3.1) ermittelt. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

### **2.2.3. Vorversuche zur Etablierung des mikroskopischen Phagozytoseassays**

#### ***I. Beschichtung der 12-Well Zellkulturtestplatte mit Kollagen A oder Poly-L-Lysin***

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Mikrogliazellen bei einer Beschichtung der Deckgläser mit Kollagen A oder mit Poly-L-Lysin optimal haften blieben. Für die Beschichtung der Deckgläser mit Kollagen A wurde dieses mit PBS auf 0,5 mg/ml verdünnt und ca. 300 µl dieser Verdünnung in jedes Well auf das Deckglas überführt. Nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde das Deckglas mit PBS gewaschen. Für die Beschichtung mit Poly-L-Lysin wurde 0,5 ml von diesem auf die Deckgläser geträufelt. Nach fünf Minuten konnte dies wieder abgesaugt und luftgetrocknet werden.

Nun wurden die geernteten Mikrogliazellen mit 500 µl aufgewärmtem Mikrogliaedium hinzugefügt und für 24 Stunden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für vier Stunden mit 500 µl Stimuliermedium inkubiert. Dann erfolgte nach Markierung der Phagozytose (siehe Punkt 2.2.4. I d) der Vergleich der unterschiedlichen Beschichtungen unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Abbildung 12 unter Punkt 3.2.I.).

#### ***II. Opsonierung der Latexkügelchen mit und ohne ROS***

Die 12-Well Zellkulturtestplatte wurde wie oben beschrieben mit Poly-L-Lysin beschichtet und die Mikrogliazellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und pH von 7,4 inkubiert. Die Latexkügelchen wurden am nächsten Tag vor der Phagozytose mit ROS opsoniert [Klettner et al. 2011]. Zur Herstellung der ROS wurden zwölf Schweineretinae mit 10 ml Homogenisierungsmedium in einem Röhrchen 1-2 Minuten geschüttelt. Dadurch trennten sich die ROS von den Photorezeptoren und wurden durch den Sucrosegehalt im Homogenisierungsmedium in Lösung gehalten. Dann folgte ein vierminütiges Zentrifugieren bei 3800 rpm. Der Überstand, in dem sich die ROS nun befanden, wurde entnommen und in zwei Röhrchen mit 10 mM 2-[4-(2-Hydroxyethyl) -1-Piperatiny] -ethansulfonat (HEPES) verdünnt. Erneut wurde für vier Minuten bei 3800 rpm zentrifugiert. Das Pellet mit den ROS wurde in 5 ml HEPES überführt und 30-mal durch eine 20-gauge Spritze gezogen. Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BioRad Proteinassay mit BSA als Standard [Klettner et al. 2011].

Die Opsonierung der Latexkügelchen sollte die Phagozytose erleichtern, wie es bereits bei Phagozytoseexperimenten mit RPE-Zellen gezeigt werden konnte [Klettner et al. 2011]. Dieser Vorversuch untersuchte, ob dieses Verfahren auch bei Mikrogliazellen anzuwenden war. Dabei wurden die Latexkügelchen (2,5 Massenprozent) mit ROS auf 1,25 % und mit NaCl auf 0,125 % verdünnt. Im Ansatz ohne ROS wurden die Latexkügelchen nur mit NaCl auf 0,25 % verdünnt. Die Gemische wurden dann für eine Stunde bei 200 rpm bei 21 °C geschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und durch 1 ml NaCl ersetzt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Am Ende wurde Stimuliermedium zu den Latexkügelchen dazugegeben, sodass die Latexkügelchen mit den ROS erneut auf 0,125 % und ohne ROS auf 0,25 % verdünnt wurden. LPS wurde mit PBS auf 1 µg/ml verdünnt. Zu den Mikrogliazellen wurde Stimuliermedium appliziert. Das

LPS befand sich im Stimuliermedium in einer Konzentration von 50 ng/ml. Die Latexkügelchen mit ROS wurden im Stimuliermedium auf 0,0125 % und ohne ROS auf 0,025 % verdünnt und für vier Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Markierung der Phagozytose (Punkt 2.2.4 I. d) unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Abb. 13 unter Punkt 3.2.II.).

### **III. Inkubation mit gereinigten und nicht gereinigten Latexkügelchen**

Die 12-Well Zellkulturtestplatte wurde wie oben beschrieben mit Poly-L-Lysin beschichtet und die Mikrogliazellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 für 24 Stunden inkubiert. Die nicht gereinigten Latexkügelchen wurden am nächsten Tag mit Stimuliermedium verdünnt und nicht gereinigt. Die Latexkügelchen, die gereinigt werden sollten, wurden mit NaCl verdünnt. Nach kurzem Zentrifugieren wurde der Überstand abgesaugt und durch 1 ml NaCl ersetzt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Nach dem dritten Zentrifugieren wurde zu den gereinigten Latexkügelchen erneut Stimuliermedium appliziert, sodass die Konzentration an Latexkügelchen in beiden Ansätzen dieselbe war. LPS wurde mit PBS auf 1 µg/ml verdünnt. Zu den Mikrogliazellen wurde Stimuliermedium gegeben, in welches entweder gereinigte oder nicht gereinigte Latexkügelchen hinzugefügt wurde. Das LPS befand sich am Ende im Stimuliermedium in einer Konzentration von 50 ng/ml. Nach vier Stunden Inkubation erfolgte die Auswertung nach Markierung der Phagozytose (siehe Punkt 2.2.4. I d) unter dem Fluoreszenzmikroskop (siehe Abb. 14 unter Punkt 3.2.III.).

### **IV. Etablierung mit verschiedenen Konzentrationen von LPS**

Die 12-Well Zellkulturtestplatte wurde wie oben beschrieben mit Poly-L-Lysin beschichtet und die Mikrogliazellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 für 24 Stunden inkubiert. LPS wurde mit PBS auf 1 µg/ml verdünnt. Zu den Mikrogliazellen wurden Stimuliermedium und gereinigte nicht opsonierte Latexkügelchen appliziert. Zum Vergleich befand sich das LPS in den Wells in einer Konzentration von 0 ng/ml, 50 ng/ml oder 100 ng/ml. Mit diesem Versuch sollte die für die Phagozytose optimale LPS-Konzentration ermittelt werden, da wie bereits unter 1.2.3.2 erwähnt wurde, LPS als einer der stärksten Aktivatoren der Mikrogliazelle gilt. Die Inkubation mit LPS und den Latexkügelchen dient in den späteren Phagozytoseassays als Maximalwert in der Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen. Die Auswertung erfolgte nach vier Stunden Inkubation und nach der Markierung der Phagozytose (siehe Punkt 2.2.4. I d) unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dazu wurde der prozentuale Anteil der Zellen auf den Fotos ermittelt, der Latexkügelchen phagozytierte (siehe Abb.15 unter Punkt 3.2.IV.).

### **V. Etablierung mit verschiedenen Konzentrationen von gereinigten Latexkügelchen**

Die 12-Well Zellkulturtestplatte wurde wie oben beschrieben mit Poly-L-Lysin beschichtet und die Mikrogliazellen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 für 24 Stunden inkubiert. LPS wurde mit PBS auf 1 µg/ml verdünnt. Die Zellen wurden mit Stimuliermedium, 50 ng/ml LPS und 0,005 %, 0,025 % oder 0,05 % der gereinigten Latexkügelchen für vier Stunden inkubiert. Die Auswertung

erfolgte nach Markierung der Phagozytose (siehe Punkt 2.2.4. I d) unter dem Fluoreszenzmikroskop. Dazu wurde der prozentuale Anteil der Zellen auf den Fotos ermittelt, der Latexkügelchen phagozytierte (siehe Abb.16 unter Punkt 3.2.V.).

#### **2.2.4. Hauptversuche**

Unter den in den Vorversuchen etablierten Bedingungen konnte über einen mikroskopischen und fluorometrischen Phagozytoseassay in den Hauptversuchen geprüft werden, welchen Einfluss TLR-3 stimulierte RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen besitzen. Hierzu wurden die Mikrogliazellen vier Stunden lang mit fluoreszierenden Latexkügelchen und mit oder ohne Überständen von TLR-3 stimulierten RPE-Zellen inkubiert. Der Unterschied in der Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen, die mit und die ohne Überständen von stimulierten RPE-Zellen inkubiert wurden, wurde sowohl mikroskopisch als auch fluorometrisch mithilfe eines Fluoreszenzmessers geprüft.

##### **2.2.4.1. Mikroskopischer Phagozytoseassay**

###### *a) Stimulation der RPE-Zellen*

Für die Stimulation der RPE-Zellen wurden Zellen aus der F2-Generation verwendet, die eine Konfluenz aufwiesen. Diese wurden für 24 h mit Poly I:C stimuliert. Dazu wurde das Medium aus jeder Schale abgesaugt und durch 3 ml Stimuliermedium ersetzt. Im Stimuliermedium der Schalen wurde Poly I:C in einer Konzentration von 0 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml appliziert. Die Zellkulturschalen wurden dann für 24 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 inkubiert und das Medium gewonnen.

###### *b) Inkubation der Mikrogliazellen auf der 12-Well Platte*

Eine 12-Well Platte wurde wie unter Punkt 2.2.3. I. beschrieben mit Poly-L-Lysin beschichtet. Nun wurde in jedes Well 0,5 ml erwärmtes (37 °C) Mikrogliaedium pipettiert. Dazu kamen 400.000 – 500.000 Zellen in 0,2 ml Mikrogliaedium pro Well. Nun wurde die Platte für 48 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 aufbewahrt.

###### *c) Inkubation der Mikrogliazellen*

Aus der zwei Tage zuvor angesetzten Well Platte wurde das Mikrogliaedium abgesaugt. Die zwölf Wells wurden nun wie in Abb. 7 gefüllt. In sieben der zwölf Wells wurde Stimuliermedium gegeben. LPS wurde mit PBS auf 1 µg/ml und in einer Well im Stimuliermedium auf 50 ng/ml verdünnt (Abb. 7, rot). Das Poly I:C wurde in insgesamt fünf Wells (Abb. 7, hellblau) mit dem Stimuliermedium auf jeweils 0 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml verdünnt. Den RPE-Zellüberstand erhielt man aus den vom Vortag mit verschiedenen Poly I:C- Konzentrationen stimulierten RPE-Zellen. Dieser wurde in insgesamt fünf Wells (Abb. 7, grün) pipettiert. Die Latexkügelchen wurden in insgesamt elf Wells pipettiert, sodass sich in einem Well für die Negativkontrolle (Abb. 7, dunkelblau)

nur Stimuliermedium befand. Die Platte wurde nun bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 für vier Stunden inkubiert.

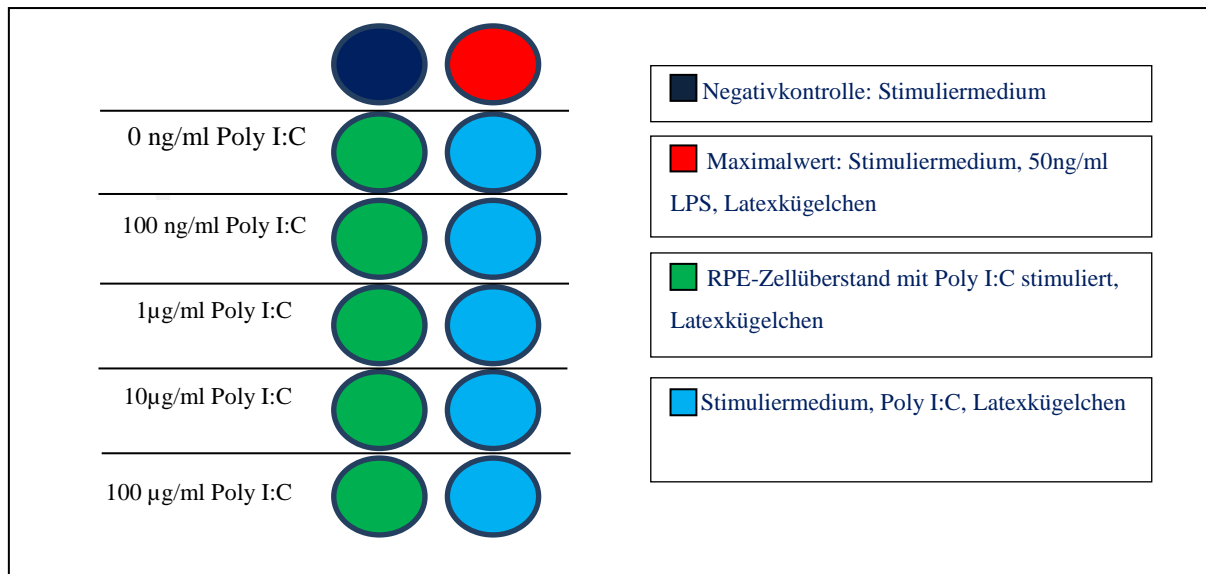


Abbildung 7: Grafische Darstellung der Zellkulturtestplatte des mikroskopischen Phagozytoseassays.

#### d) Markierung der Phagozytose

Nach Ablauf der Zeit erfolgte lichtgeschützt die Markierung der Phagozytose. Zunächst wurde jedes Well zweimal mit PBS gewaschen, um überschüssige Latexkügelchen zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit PBS-Azid gewaschen, um diese abzutöten und so eine weitere Aufnahme zu stoppen. Das PBS-Azid wurde wieder abgesaugt und 2,5 %iges Paraformaldehyd (PFA) auf die Zellen gegeben. Nach zehn Minuten bei Raumtemperatur konnte das PFA wieder abgenommen und mit PBS gewaschen werden. Dann wurde Ethanol/Aceton (1:1) auf die Zellen gegeben, die dann für zehn Minuten bei -20 °C gekühlt wurden. Es folgte zweimal fünfminütiges Waschen mit 1 x Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS). Dann wurden die Zellkerne mit dem Höchstfarbstoff Bisbenzimid H gefärbt. Nach der Verdünnung des Höchstfarbstoffes mit TBS auf 2,5 µg/ml, wurden 300 µl pro Well auf die Deckgläser pipettiert. Für 30 Minuten bei 37 °C blieb der Farbstoff auf den Zellen, bis er abgesaugt und diese zweimal fünf Minuten mit Tween-TBS (T-TBS) und dreimal zehn Minuten mit TBS gewaschen wurden. Dann wurden die Deckgläser mit *Slowfade* Eindeckmedium auf Objektträger eingedeckelt. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur während der Nacht folgte das Versiegeln mit Nagellack.

#### e) Fluoreszenzmikroskopie

Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop. Um möglichst objektive Aufnahmen zu erhalten, wurde das Deckglas in neun Quadranten eingeteilt (siehe Abb. 8) Pro Quadrant wurde ein Foto aufgenommen. Die Summe der Zellen auf den neun Fotos sollte mindestens über 100 sein, damit eine aussagekräftige Auswertung möglich war.



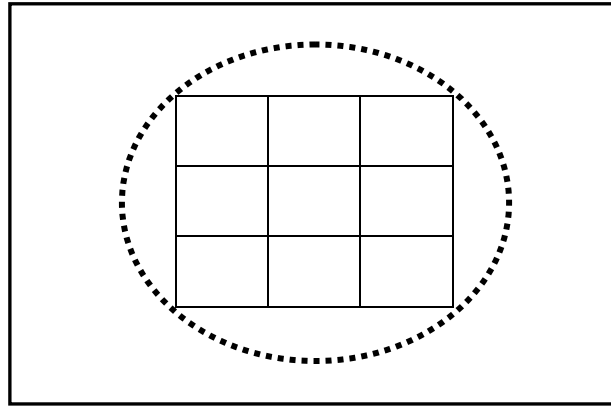


Abbildung 8: Deckglaseinteilung (Kreis) in neun Quadranten

#### f) Auswertung

Bei allen Fotos wurde der Anteil an positiven Mikrogliazellkernen ermittelt und der Mittelwert gebildet. Ein Zellkern wurde als positiv gezählt, sobald sich ein Latexkügelchen im Umfeld vom zweifachen Kernradius zum Zellkern befand (siehe Abb.9). Die Ergebnisse der einzelnen Ansätze wurden nach Abzug der Nullprobe mit dem Maximalwert (LPS-Inkubation) des jeweiligen Versuches in Relation gesetzt, damit die fünfmal durchgeführten Versuche miteinander zu vergleichen waren. Aus den Prozentwerten der fünf Versuche konnte so der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet werden.

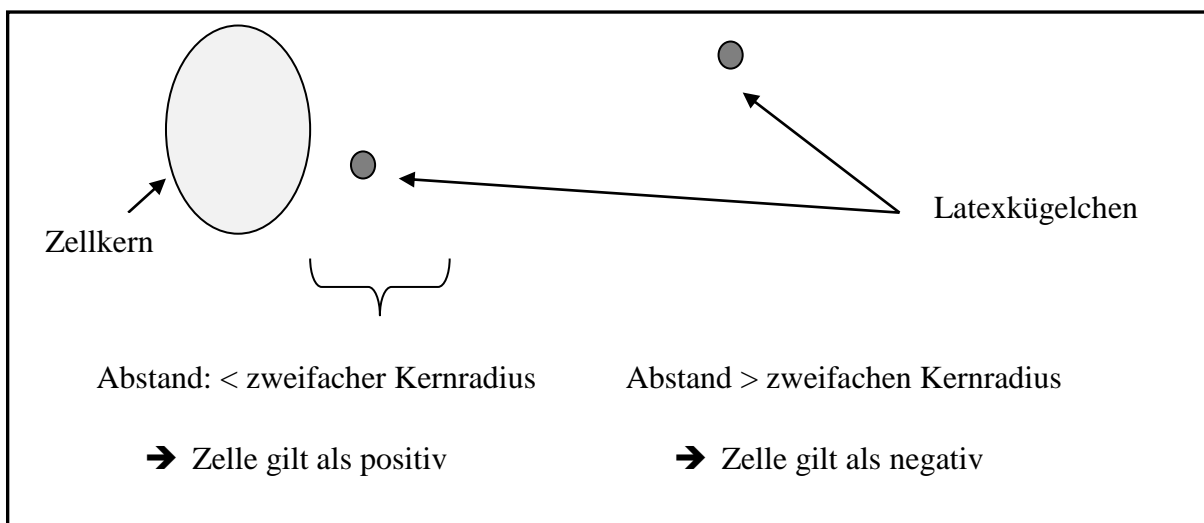


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Auswertungskriterien des mikroskopischen Phagozytoseassays. Lag ein Latexkügelchen (kleine Kreise) im zweifachen Kernradius vom Zellkern (große Ellipse) entfernt, so galt die Zelle als positiv.

#### g) Statistik

Die Signifikanz wurde mithilfe der Student-t-Verteilung geprüft.

### 2.2.4.2. Fluorometrischer Phagozytoseassay

#### a) *Stimulation der RPE-Zellen*

Die Stimulation erfolgte wie sie unter Punkt 2.2.4.1. a) erläutert wird.

#### b) *Inkubation der Mikrogliazellen auf der 96-Well Platte*

24 Wells der 96-Well Platte wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dies erfolgte wie unter dem Punkt 2.2.3 I. beschrieben, jedoch mit 50 µl Poly-L-Lysin pro Well. Nach der Lufttrocknung kamen in jede Well 200 µl der geernteten Zellsuspension, sodass sich in jeder Well 100.000-200.000 Zellen befanden. Dann wurde die Well Platte für 48 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 inkubiert.

#### c) *Inkubation der Mikrogliazellen*

Aus der zwei Tage zuvor angesetzten Well Platte wurde vorsichtig das Mikrogliaedium herauspipettiert. Von den 24 Wells wurden jeweils zwei mit dem gleichen Inhalt gefüllt, sodass sich insgesamt 12 unterschiedliche Wells ergaben. Diese zwölf Wells wurden nun wie in Abb. 10 gefüllt:

In sieben Wells wurde Stimuliermedium pipettiert. LPS wurde mit PBS auf 1 µg/ml verdünnt und in einer Well (Abb. 10, rot) mit dem Stimuliermedium auf 50 ng/ml verdünnt. Das Poly I:C wurde in vier Wells (Abb. 10, hellblau) im Stimuliermedium auf 0 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml konzentriert. RPE-Zellüberstand wurde von dem vom Vortag mit verschiedenen Poly I:C-Konzentrationen stimulierten RPE-Zellen entnommen und in die letzten fünf freien Wells (Abb. 10, grün) pipettiert. In elf Wells wurden Latexkügelchen appliziert, sodass eine Well für die Negativkontrolle (Abb. 10, dunkelblau) nur Stimuliermedium enthielt.

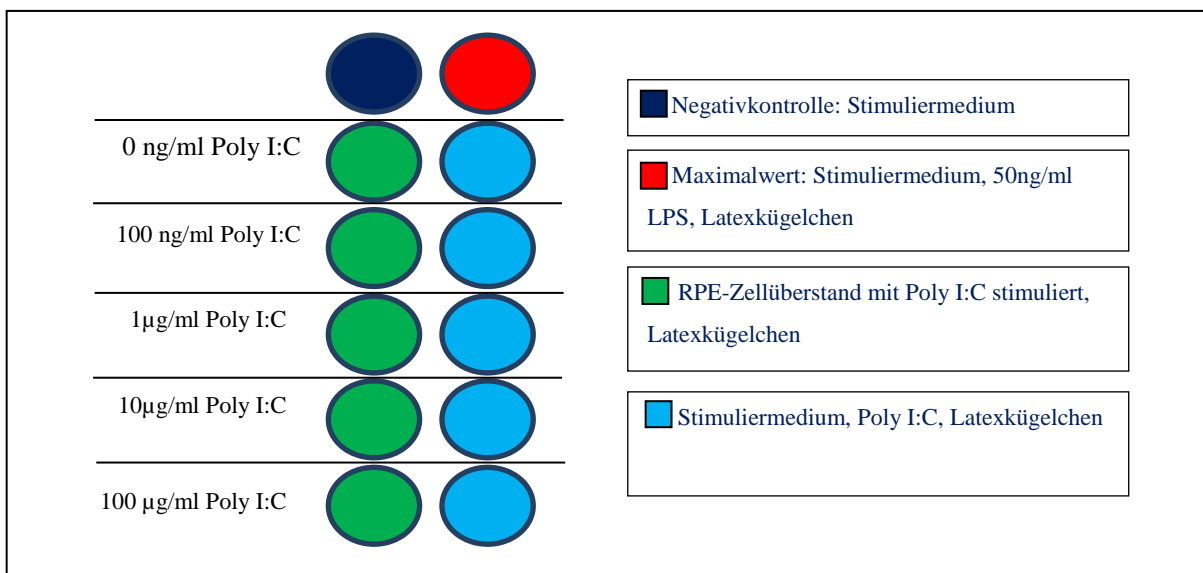


Abbildung 10: Grafische Darstellung der Zellkulturtestplatte des fluorometrischen Phagozytoseassays.

Die Platte wurde bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und einem pH von 7,4 für vier Stunden inkubiert.

#### *d) Waschen*

Nach vier Stunden wurden die Wells dreimal mit 200 µl PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurde 100 µl farbloses DMEM in die Wells gegeben.

#### *e) Standardreihe erstellen*

Für die Standardreihe wurde eine Verdünnungsreihe durchgeführt. Es wurde ein Eppendorfröhrchen mit PBS gefüllt. Latexkügelchen wurden in diesem Eppendorfröhrchen auf 0,0125 % verdünnt. In weiteren elf Eppendorfröhrchen wurden die Latexkügelchen in ihrer Konzentration immer weiter halbiert. Von jedem Eppendorfröhrchen wurde die jeweilige Konzentration in jeweils ein Well gegeben.

#### *f) Fluoreszenzmesser*

Im Fluoreszenzmesser wurde die Fluoreszenz der Wells gemessen. Dabei wurde die Platte mit Licht der Wellenlänge 485 nm belichtet (Exzitation: 485 nm). Ein zweites optisches System erfasste das Licht, welches von der Platte emittiert wurde (Emission: 518 nm).

#### *g) Auswertung*

Von den Werten der Wells mit dem gleichen Inhalt wurde der Mittelwert gebildet und der Nullwert abgezogen. Der Nullwert bildete sich aus dem Mittelwert der beiden Wells, die nur mit Stimuliermedium gefüllt wurden. Die Wells, in denen die Mikrogliazellen direkt mit LPS stimuliert wurden, bildeten aus ihrem Mittelwert nach Abzug des Nullwertes den Maximalwert. Mit ihm wurden die Werte der anderen Ansätze in Relation gesetzt. Aus den Prozentwerten der verschiedenen Ansätze des insgesamt fünfmal durchgeführten Versuchs konnte so der Mittelwert und die Standardabweichung der verschiedenen Ansätze gebildet werden.

#### *h) Statistik*

Die Signifikanz wurde mithilfe der Student-t-Verteilung geprüft.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Kultur der Mikrogliazelle**

Mit dem Iba-1-Antikörper sollte nachgewiesen werden, dass es sich in der Kultur um Mikrogliazellen handelte. Iba-1 ist ein Calcium bindendes Protein, welches sich im zentralen Nervensystem nur auf Mikrogliazellen befindet [Ito et al. 1998]. Abbildung elf zeigt sowohl die Fotos als auch die Ergebnisse in Form eines Balkendiagrammes an:

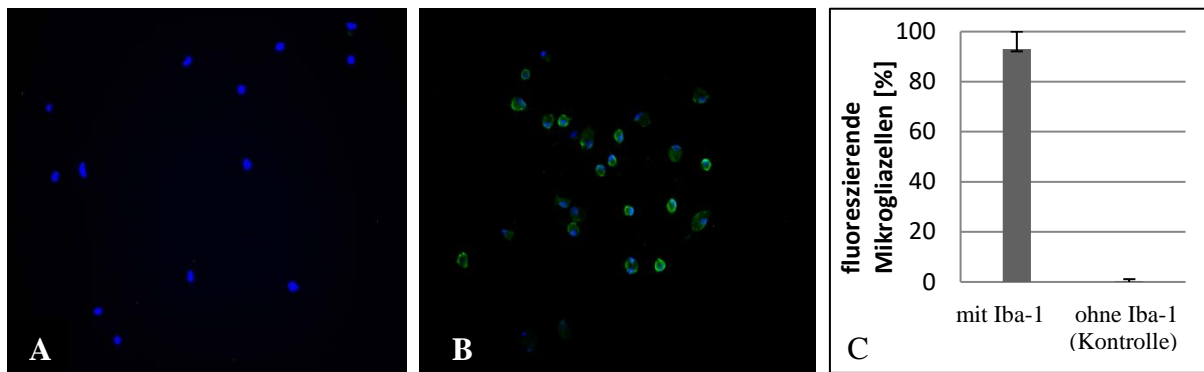


Abbildung 11: Fotos und Auswertung der Iba-1 Färbung der Mikrogliazellen. A: Foto der Negativkontrollen der Iba-1-Antikörperfärbung; B: Foto der Ergebnisse der Iba-1-Antikörperfärbung. Zellkerne blau gefärbt, Fluoreszenz gelbgrün.; C: Balkendiagramm der Ergebnisse der Iba-1 Färbungen. Die Ordinate gibt den Prozentanteil der Mikrogliazellen an, der eine Fluoreszenz aufwies und somit als positiv gewertet wurde. Auf der Abszisse sind je ein Balken für die Negativkontrolle (hier nicht zu sehen, da der Anteil sehr gering war) und das Ergebnis zu finden.

Die Auswertung der Iba1-Färbung ergab, dass über 90 % der Zellen, die mit dem Antikörper Iba-1 und dem fluoreszierenden Antikörper inkubiert wurden, fluoreszierten. Im Durchschnitt fluoreszierten 93,22 % der Zellen ( $\pm 6,9$  %). Wohingegen die Zellen, die nur mit dem fluoreszierenden Antikörper gefärbt wurden (Kontrolle), zu maximal 0,54 % ( $\pm 0,8$  %) fluoreszierten (siehe Balkendiagramm in Abbildung 11 C). Dieser Wert konnte mit der Eigenfluoreszenz der Mikrogliazellen erklärt werden. Aufgrund der Ergebnisse konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass es sich in der Kultur um Mikrogliazellen handelte.

### 3.2. Vorversuche zur Etablierung des Phagozytoseassays

#### I. Beschichtung der 12-Well Zellkulturtestplatte mit Kollagen A oder Poly-L-Lysin

Die Deckgläser für den mikroskopischen Assay wurden entweder mit Kollagen A oder mit Poly-L-Lysin beschichtet. Bei der Beschichtung der Deckgläser mit Kollagen A wurden unter dem Mikroskop nur wenige Mikrogliazellen gefunden, wohingegen bei der Beschichtung mit Poly-L-Lysin deutlich mehr Mikrogliazellen aufzuweisen waren (siehe Abbildung 12). Dies wies darauf hin, dass die Mikrogliazellen am Poly-L-Lysin besser haften blieben, weshalb alle folgenden Versuche mit Poly-L-Lysin durchgeführt wurden.

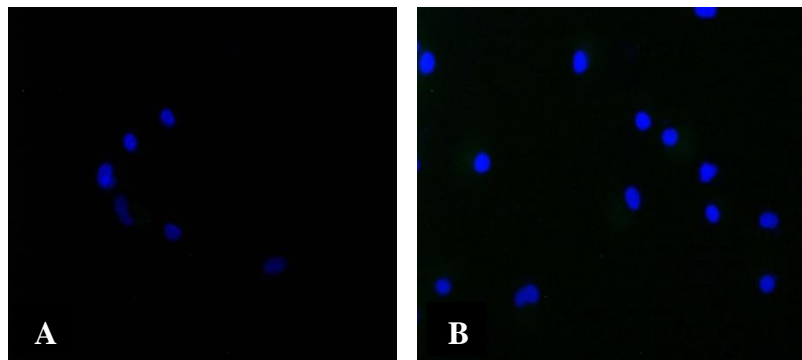
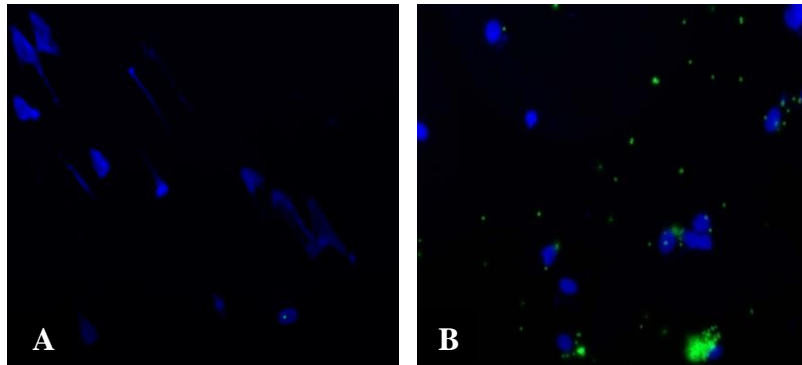


Abbildung 12: Fotos der Beschichtungen mit Kollagen A oder Poly-L-Lysin. Foto A: Beschichtung mit Kollagen A; Foto B: Beschichtung mit Poly-L-Lysin; Mikrogliazellkerne mit Bisbenzimid-Farbstoff blau gefärbt.

## **II. Opsonierung der Latexkügelchen mit und ohne ROS**

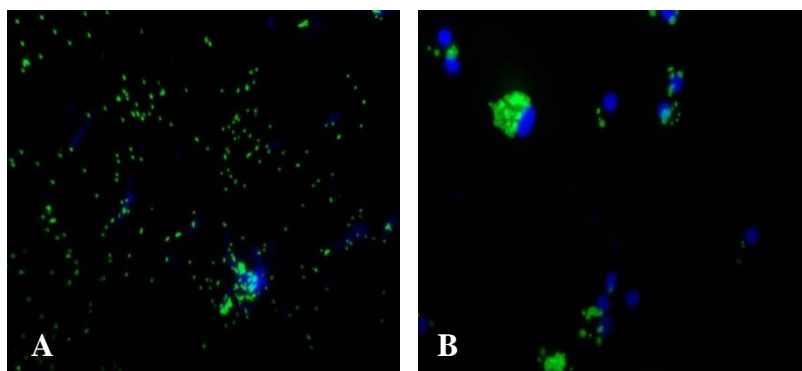
Zur Etablierung des mikroskopischen Assays wurde die Phagozytose von mit ROS opsonierten und nicht opsonierten Latexkügelchen geprüft. Bei der Opsonierung der Latexkügelchen mit ROS wurde beobachtet, dass dies zu einer Reduzierung und zum Absterben der Mikrogliazellen führte (siehe Abbildung 13 A). Die Annahme, dass eine Opsonierung mit ROS die Phagozytose für die Mikrogliazellen erleichtert, wurde somit nicht bestätigt. Alle folgenden Versuche wurden ohne Opsonierung der Latexkügelchen mit ROS durchgeführt (siehe Abbildung 13 B).



*Abbildung 13: Fotos der Phagozytose von mit und ohne ROS opsonierten Latexkügelchen. Foto A: Latexkügelchen mit ROS opsoniert; Foto B: Latexkügelchen ohne Opsonierung; Mikrogliazellkerne mit Bisbenzimid-Farbstoff blau gefärbt, Latexkügelchen fluoreszieren gelbgrün.*

## **III. Inkubation mit gereinigten und nicht gereinigten Latexkügelchen**

Bei der Etablierung des mikroskopischen Assays wurden die Zellen mit gereinigten und nicht gereinigten Latexkügelchen inkubiert. Dieser Vorversuch zeigte, dass die Mikrogliazellen die gereinigten Latexkügelchen deutlich besser phagozytierten. Zusätzlich schien es so, dass die nicht gereinigten und nicht phagozytierten Latexkügelchen bei der Markierung für Phagozytose nur schlecht ausgewaschen werden konnten, da auf diesen Bildern viele freie, nicht phagozytierte Latexkügelchen zu sehen waren (siehe Abbildung 14 A). Bei allen folgenden Versuchen wurden gereinigte Latexkügelchen verwendet (siehe Abbildung 14 B).



*Abbildung 14: Fotos der Phagozytose mit gereinigten und nicht gereinigten Latexkügelchen. Foto A: Latexkügelchen nicht gereinigt; Foto B: Latexkügelchen gereinigt; Mikrogliazellkerne mit Bisbenzimid-Farbstoff blau gefärbt, Latexkügelchen fluoreszieren gelbgrün.*

#### IV. Etablierung mit verschiedenen Konzentrationen von LPS

Bei der Etablierung des mikroskopischen Assays wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von LPS inkubiert. Die optimale LPS-Konzentration wurde in den Hauptversuchen übernommen, um einen Maximalwert der Phagozytose zu gewinnen. Abbildung 15 zeigt die Fotos und die Ergebnisse in Form eines Balkendiagrammes an.

Dieser Vorversuch zeigte, dass optimale Bedingungen für die Phagozytose bei einer Konzentration von 50 ng/ml LPS erreicht wurden. Aufgrund dessen wurden die folgenden Versuche mit dieser Konzentration von LPS durchgeführt.

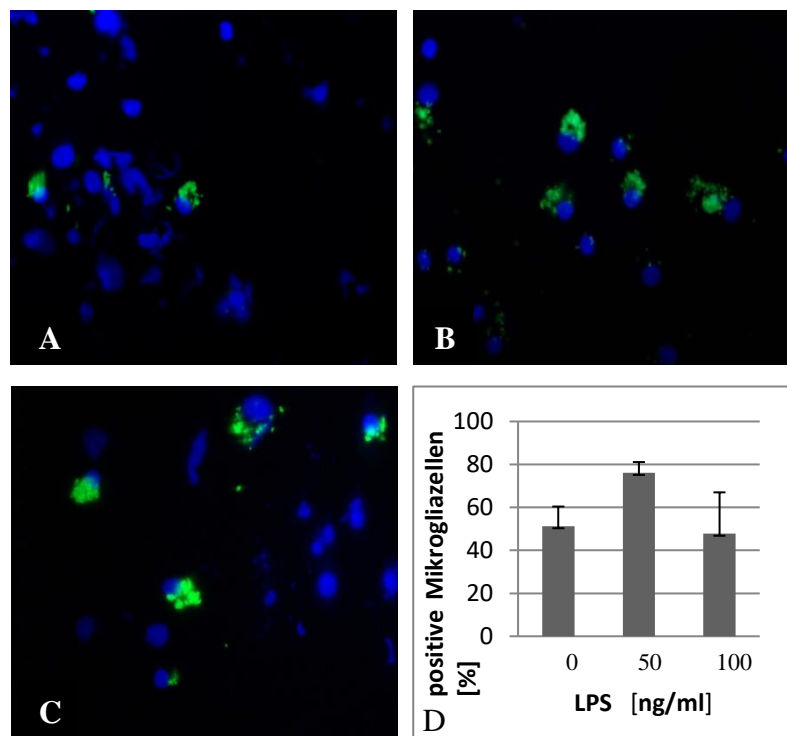


Abbildung 15: Fotos und Ergebnisse der Phagozytose bei verschiedenen Konzentrationen an LPS. A: Foto ohne LPS; B: Foto mit 50 ng/ml LPS; C: Foto 100 ng/ml LPS; Mikrogliazellkerne mit Bisbenzimid-Farbstoff blau gefärbt, Latexkugeln fluoreszieren gelbgrün; D: Balkendiagramm zur Darstellung der Phagozytoseaktivität bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von LPS. Die Ordinate gibt den Anteil an positiven Mikrogliazellen in Prozent wieder. Die Abszisse stellt die drei LPS-Konzentrationen dar.

#### V. Etablierung mit verschiedenen Konzentrationen von gereinigten Latexkugeln

Bei der Etablierung des mikroskopischen Assays wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von verdünnten Latexkugeln inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden Fotos aufgenommen, die zusammen mit den Ergebnissen in Form eines Balkendiagrammes in Abbildung 16 zu sehen sind.

Aus diesem Vorversuch wurde deutlich, dass bei einer Inkubation mit 500  $\mu$ l Stimuliermedium, 50 ng/ml LPS und auf 0,05 % verdünnte Latexkügelchen die höchste Phagozytoserate erzielt wurde. Auf Grund dessen wurden alle folgenden Versuche mit 0,05 % verdünnten gereinigten Latexkügelchen durchgeführt.

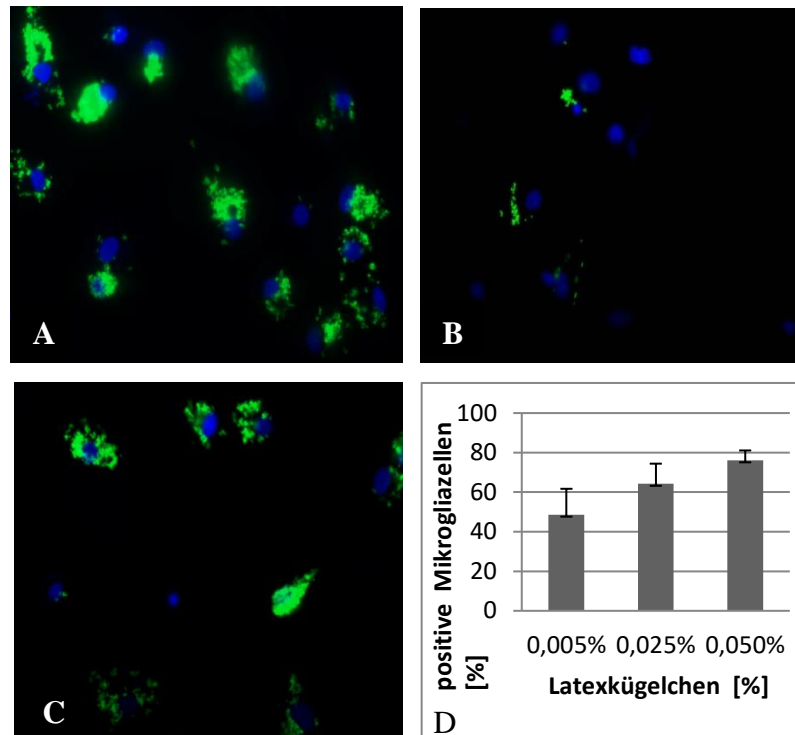


Abbildung 16: Fotos der Phagozytose mit verschiedenen Konzentrationen an Latexkügelchen. Foto A: 0,05 % Latexkügelchen; Foto B: 0,005 % Latexkügelchen; Foto C: 0,025 % Latexkügelchen; Mikrogliazellkerne mit Bisbenzimid-Farbstoff blau gefärbt, Latexkügelchen fluoreszieren gelbgrün; D: Balkendiagramm zur Darstellung der Phagozytoseaktivität bei Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Latexkügelchen. Die Ordinate gibt den Anteil an positiven Mikrogliazellen in Prozent wieder. Die Abszisse stellt die drei Latexkügelchen-Konzentrationen dar.

### 3.3. Hauptversuche

#### 3.3.1. Mikroskopischer Phagozytoseassay

Pro Well wurden neun Fotos gemacht. Von diesen Fotos wurde der relative Anteil der Zellen errechnet, der fluoreszierende Latexkügelchen phagozytierte. Unter dem Punkt 2.2.4.1. f (Abb. 9) ist dargestellt, ab wann eine Zelle als positiv galt. Auf der nun folgenden Seite werden die Fotos der verschiedenen Ansätze gezeigt (Abbildung 17).

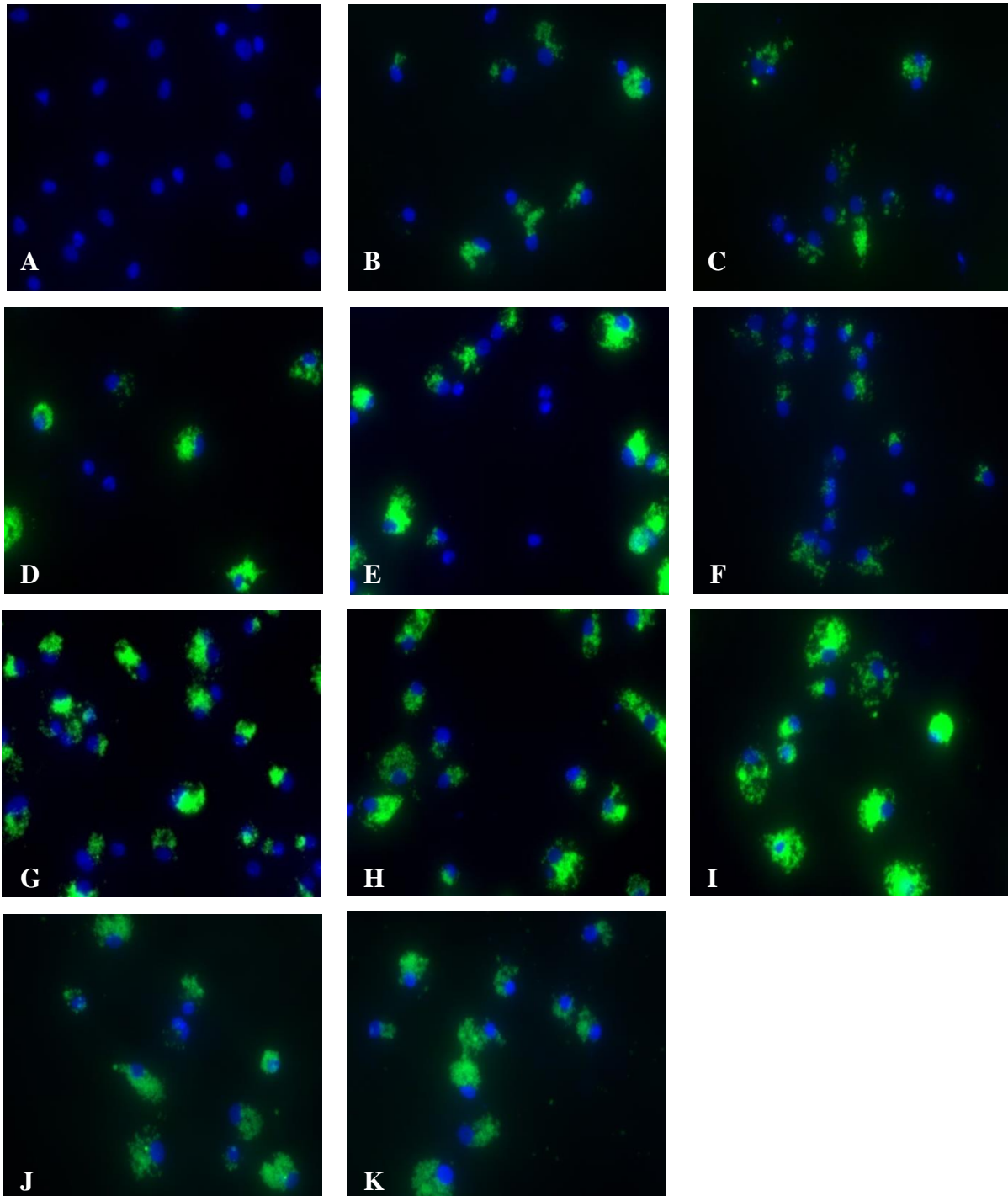


Abbildung 17: Fotos der mikroskopischen Phagozytoseassays; Foto A: Nullprobe: Inkubation mit Stimuliermedium; Foto B: Inkubation mit Stimuliermedium und Latexkügelchen; Foto C: Inkubation mit Überstand von RPE-Zellen, die ohne Poly I:C stimuliert wurden, und Latexkügelchen; Foto D: Inkubation mit Stimuliermedium, 100 ng/ml Poly I:C und Latexkügelchen; Foto E: Inkubation mit Überstand von RPE-Zellen, die mit 100 ng/ml Poly I:C stimuliert wurden, und Latexkügelchen; Foto F: Inkubation mit Stimuliermedium, 1 µg/ml Poly I:C und Latexkügelchen; Foto G: Inkubation mit Überstand von RPE-Zellen, die mit 1 µg/ml Poly I:C stimuliert wurden, und Latexkügelchen; Foto H: Inkubation mit Stimuliermedium, 10 µg/ml Poly I:C und Latexkügelchen; Foto I: Inkubation mit Überstand von RPE-Zellen, die mit 10 µg/ml Poly I:C stimuliert wurden, und Latexkügelchen; Foto J: Inkubation mit Stimuliermedium, 100 µg/ml Poly I:C und Latexkügelchen; Foto K: Inkubation mit Überstand von RPE-Zellen, die mit 100 µg/ml Poly I:C stimuliert wurden, und Latexkügelchen; Mikrogliazellkerne mit Bisbenzimid-Farbstoff blau gefärbt, Latexkügelchen fluoreszieren gelbgrün;



Bei den mikroskopischen Phagozytoseassays ergab sich nach fünfmaliger Durchführung eine durchschnittliche Nullprobe von 0,26 % (+/- 0,59 %). Dieser Wert konnte mit der beobachteten Eigenfluoreszenz der Mikrogliazellen erklärt werden. Der durchschnittliche Maximalwert wurde mithilfe der Inkubation mit LPS ermittelt und lag bei 71,2 % (+/- 12,04 %). Im folgenden Balkendiagramm (Abbildung 18) sind die Endergebnisse der mikroskopischen Phagozytoseassays dargestellt:

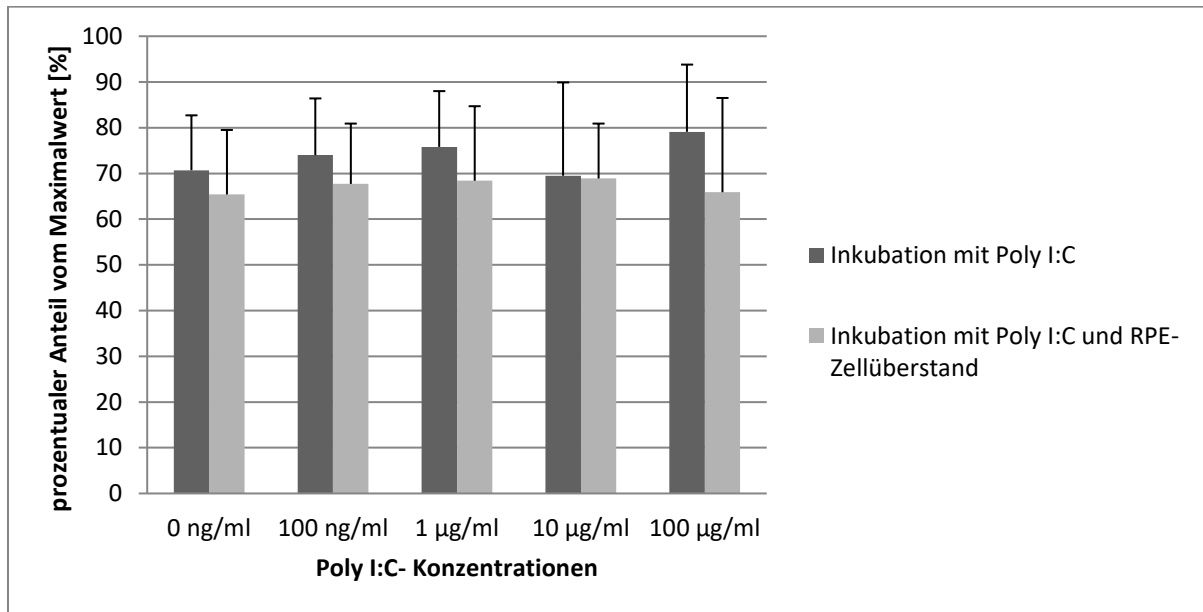


Abbildung 18: Balkendiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der mikroskopischen Phagozytoseassays. Die Ordinate gibt den Anteil vom Maximalwert der Phagozytoseaktivität prozentual wieder. Auf der Abszisse werden die Nullprobe und die verschiedenen Poly I:C-Konzentrationen gezeigt. Die dunkelgrauen Balken geben die Phagozytoserate der Mikrogliazellen wieder, die nur mit Stimuliermedium, Latexkügelchen und Poly I:C direkt inkubiert wurden. Die hellgrauen Balken geben die Phagozytoserate der Mikrogliazellen wieder, die mit Latexkügelchen und mit Überstand von RPE-Zellen, die mit Stimuliermedium und Poly I:C stimuliert wurden, wieder.

Der p-Wert wurde mithilfe des zweiseitigen Student-t-Tests ermittelt. In dem mikroskopischen Phagozytoseassay wurde kein signifikanter Unterschied in der Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen, die mit und die ohne RPE-Zellüberständen inkubiert wurden, beobachtet. Somit konnte in dem mikroskopischen Phagozytoseassay nicht nachgewiesen werden, dass die Substanzen, die die RPE-Zellen nach Stimulation des TLR-3 freisetzen, eine signifikante Auswirkung auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen haben. Auch konnte keine steigende Phagozytoserate bei steigenden Konzentrationen von Poly I:C festgestellt werden.

### 3.3.2. Fluorometrischer Phagozytoseassay

Das Balkendiagramm in Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse der fluorometrischen Assays. Nach fünfmaliger Durchführung ergab sich eine durchschnittliche Nullprobe von 0,874 a.u. (+/- 0,03 a.u.) und durch die Inkubation mit LPS ein Maximalwert von 48,52 a.u. (+/- 39,67 a.u.).

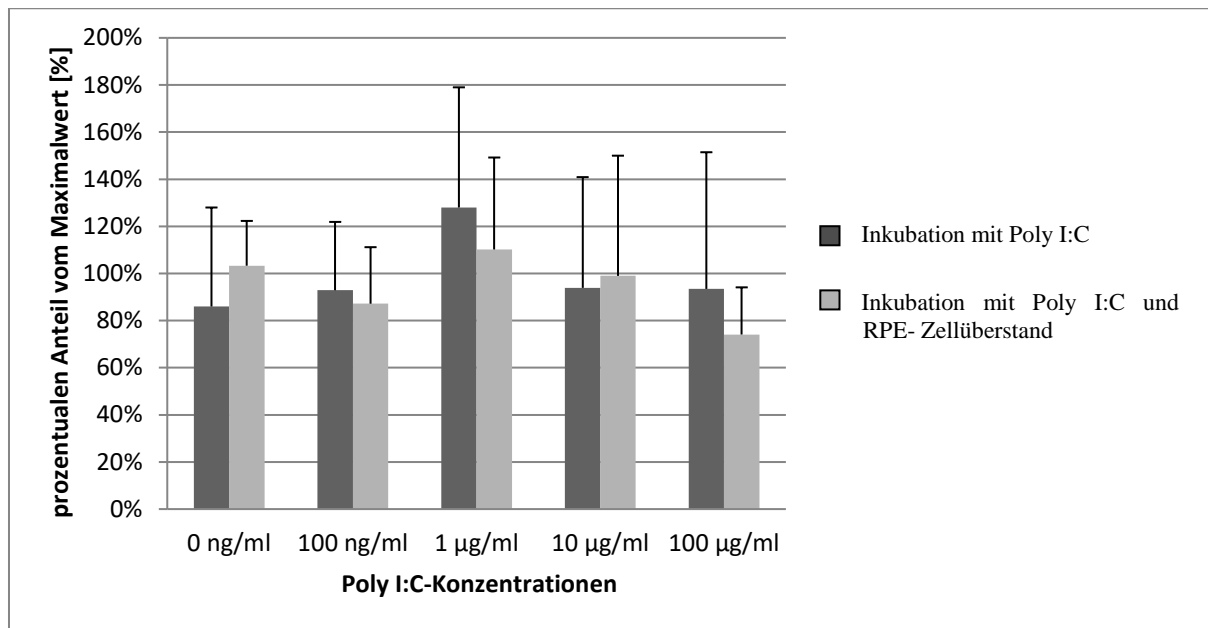


Abbildung 19: Balkendiagramm zur Darstellung der Ergebnisse der fluorometrischen Phagozytosesays. Die Ordinate gibt den Anteil vom Maximalwert der Phagozytoseaktivität prozentual wieder. Auf der Abszisse werden die verschiedenen Poly I:C- Konzentrationen gezeigt. Die dunkelgrauen Balken geben die Phagozytoserate der Mikrogliazellen wieder, die mit Stimuliermedium, Latexkügelchen und Poly I:C direkt inkubiert wurden. Die hellgrauen Balken geben die Phagozytoserate der Mikrogliazellen wieder, die mit Latexkügelchen und mit Überstand von RPE-Zellen, die mit Stimuliermedium und Poly I:C stimuliert wurden, wieder.

Der p-Wert wurde mithilfe des zweiseitigen Student-t-Tests ermittelt. Es konnte keine Signifikanz festgestellt werden. Dies bedeutet, dass im fluorometrischen Assay weder ein stimulierender noch ein inhibierender Einfluss der TLR-3 stimulierten RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen beobachtet werden konnte. Auch in diesem Assay konnte keine steigende Phagozytoserate bei steigenden Konzentrationen von Poly I:C festgestellt werden.

#### 4. Diskussion

Die Retina ist ein Bestandteil des zentralen Nervensystems und somit eine immunprivilegierte Zone. In den Mikrogliazellen hat die Evolution es vollbracht, die schädigende Kraft des Immunsystems und die Verletzbarkeit des zentralen Nervensystems auf einen Nenner zu bringen [Streit 2002]. War um 1980 die Existenz dieser Zelle weitgehend ungewiss, so steigt das Interesse der Wissenschaft an ihr kontinuierlich. Ein minimales Ungleichgewicht in der Aktivität der Mikrogliazellen kann zum Untergang neuronaler Zellen führen. Wie dieses Ungleichgewicht entsteht, ist noch nicht vollständig geklärt. In dieser Arbeit wurde der Einfluss TLR-3 stimulierter RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen untersucht. Hierfür wurde sowohl eine RPE- als auch eine Mikrogliazellkultur erstellt. Die Mikrogliazellen wurden mithilfe einer Iba-1 Antikörperfärbung nachgewiesen. Die geernteten RPE-Zellen wurden mithilfe von Poly I:C über ihren TLR-3 Rezeptor stimuliert und der Überstand gewonnen. Die geernteten Mikrogliazellen wurden über einen bestimmten Zeitraum mit fluoreszierenden Latexkügelchen und entweder mit oder ohne Überstand von TLR-3 stimulierten RPE-Zellen inkubiert. Mithilfe von mikroskopischen und fluorometrischen

Assays wurde verglichen, ob die TLR-3 stimulierten RPE-Zellen einen stimulierenden, inhibierenden oder keinen Einfluss auf die Phagozytoseaktivität der retinalen Mikrogliazellen besitzen.

#### 4.1. Kritische Diskussion der Methoden

Die Mikrogliazellen in der Kultur wurden mithilfe der Iba-1 Färbung als solche identifiziert. Iba-1 ist ein Kalzium bindendes Protein, welches sich im zentralen Nervensystem auf Mikrogliazellen befindet [Ito et al. 1998], aber nie auf Neuronen oder Astrozyten gefunden wurde. Jedoch wird Iba-1 auch von Makrophagen und Monozyten anderer Gewebearten exprimiert (Alveolarmakrophagen, Kupfferzellen). Dies bedeutet, dass Iba-1 zwar makrophagen- aber nicht mikroglia-spezifisch ist [Imai et al 2002]. Die Mikrogliazellkultur wurde auf den Grundlagen von Richardson et al. 1993, welche 2014 für Mikrogliazellen optimiert wurde [Klettner et al. 2014], erstellt. Hiernach befindet sich auf dem Boden der Zellkulturflaschen eine Schicht aus Astrozyten und Mikroglia-progenitorzellen. Die Astrozyten sezernieren Wachstumsfaktoren, darunter den *Colony Stimulating Faktor-1 (CSF-1)*, der zur Umwandlung der Mikroglia-progenitorzellen in Mikrogliazellen führt. Die Mikrogliazellen lösen sich vom Boden der Zellkulturflasche und können im Medium geerntet werden. Aufgrund dessen kann es sich in der Kultur nicht um Makrophagen gehandelt haben, da diese nicht aus einer Mikroglia-progenitorzelle entstehen können.

Ein weiteres Problem der Mikrogliazellkultur war, dass die Zellen in ihr bereits eine gewisse Grundaktivität besaßen. Zu erkennen ist dies auch in den Aufnahmen der Iba-1 Färbung. Auf den Bildern sind die Mikrogliazellen stets als amöboide Zellen und nicht im ramifizierten deaktivierten Zustand zu sehen. Eventuell war so eine Steigerung der Phagozytoseaktivität in diesem aktiven Zustand nicht mehr möglich, sodass keine Unterschiede in den Versuchen gesehen werden konnten.

Während des Phagozytoseassays phagozytierten die Mikrogliazellen zum Teil die Latexkügelchen in so großen Mengen, dass es unmöglich war, die Menge an phagozytierten Latexkügelchen näher zu quantifizieren. Eine genauere Einteilung der Zellen in verschiedene Unterscheidungsguppen, vergleichbar mit Klettner 2011 mit RPE-Zellen, und so eine genauere Darstellung der Ergebnisse war daher nicht möglich (siehe Abbildung 20).

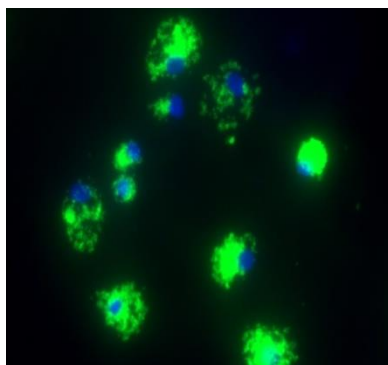


Abbildung 20: Beispiel zur Verdeutlichung der Quantifizierungsprobleme beim mikroskopischen Phagozytoseassay. Die Zellen auf dem Foto wurden alle als positiv gewertet. Eine genauere Einteilung war aufgrund der Mengen an phagozytierten Latexkügelchen nicht möglich.

In den Vorversuchen zu Etablierung der Hauptversuche wurden die Latexkügelchen mit ROS opsoniert. Dies käme der Situation in vivo am nächsten, denn auch in der Retina phagozytieren die Mikrogliazellen Bestandteile der Rezeptoraußensegmente. Normalerweise wird die Phagozytose durch bestimmte Signale der zu phagozytierenden Zelle selbst eingeleitet (*“come-get me“* Signal) [Fadock et al. 1992, Martin et al. 1995], die dazu führen, dass Makrophagen in der Umgebung chemotaktisch zu der Zelle gelockt werden. Oberflächenmoleküle (Phosphatidylserine) der Zielzelle ermöglichen es der Makrophage/Mikroglia die Zelle aufzunehmen (*“eat-me“* Signal) [Fadock et al. 1992, Martin et al. 1995].

Weiterhin regt die Phagozytose von ROS die Mikrogliazellen zur IL-1 $\beta$ -, Chemokinligand-2- (Ccl-2) und TNF-Produktion an. Bei der Phagozytose von reinen Latexkügelchen bleibt die Produktion dieser Faktoren hingegen aus [Kohn et al. 2013]. Da die Opsonierung der Latexkügelchen in den Vorversuchen jedoch zum Absterben der Mikrogliazellen führte, wurden die Hauptversuche mit reinen Latexkügelchen durchgeführt, was den Unterschied zu der Situation in vivo vergrößert.

Auch muss beachtet werden, dass die Aktivität und die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen nicht miteinander korrelieren müssen. So exprimieren Mikrogliazellen, die apoptotische Zellen phagozytieren, kein proinflammatorisches IL-1 $\beta$  [Hughes et al. 2010]. Dies passt mit der Beobachtung zusammen, dass die Phagozytose von apoptotischen Zellen einen antiinflammatorischen und damit wenig aktiven Phänotyp bei der Mikrogliazelle induziert [Takahashi et al. 2005]. Dies bedeutet, dass durch diese Arbeit keine Rückschlüsse auf den Einfluss der über den TLR-3 stimulierten RPE-Zellen auf die Aktivität der Mikrogliazellen gezogen werden können.

#### **4.2. Einordnung der Ergebnisse in die Literatur**

Sowohl in den mikroskopischen als auch in den fluorometrischen Assays zeigte sich weder ein stimulierender noch ein inhibierender Einfluss der TLR-3 stimulierten RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen.

Das RPE bildet eine Blut-Retina-Schranke zwischen den Photorezeptorzellen in der Retina und der gut durchbluteten Choroidea. Sollten sich Erreger und Bestandteile derer im Blutkreislauf befinden, so kommen diese als erstes mit dem RPE in Kontakt. Eine ähnliche Rolle nehmen die leptomeningealen Zellen ein, die die Blut-Hirn-Schranke bilden. Bei ihnen zeigte sich, dass sie bei einer systemischen inflammatorischen Reaktion im Körper mit einer Aktivierung der Mikrogliazellen im Gehirn reagierten [Wu et al. 2005]. Auch das RPE scheint diese Fähigkeit zu besitzen, bei einer systemischen inflammatorischen Reaktion, Signale an die retinalen Mikrogliazellen zu vermitteln:

Über TLR-3 stimulierte RPE-Zellen können die Mikrogliazellen zur Expression bestimmter Zytokine beeinflussen. Bei der Inkubation von Mikrogliazellen mit Poly I:C oder mit Überstand von mit Poly I:C stimulierten RPE-Zellen zeigte sich signifikant, dass die Mikrogliazellen zur Expression bestimmter Faktoren angeregt wurden. Mit einer quantitativen *Real-Time*-PCR (RT-PCR) wurden die

Konzentrationen an IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , Cyclooxygenase-2 (Cox-2) und Stickstoffmonoxid-Synthase (Isoform i, iNOS) gemessen. Es zeigte sich im Vergleich zu der direkten Stimulation der Mikrogliazellen durch Poly I:C, bei den mit dem RPE-Überstand behandelten Zellen ein sehr viel höherer Anstieg von IL-6, IL-1 $\beta$  und Cox-2. Die Konzentration an TNF- $\alpha$  hingegen erhöhte sich zwar mit steigenden Poly I:C-Konzentrationen, jedoch zeigte sich kein großer Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen. Wohingegen die Konzentration an iNOS bei den direkt durch Poly I:C stimulierten Mikrogliazellen zwar konzentrationsabhängig anstieg, sich bei der Vergleichsgruppe, die mit dem RPE-Überstand inkubiert wurde, jedoch auch bei steigenden Poly I:C-Konzentrationen kaum veränderte und somit deutlich niedriger war als bei der direkten Stimulation [Klettner et al. 2014].

Dies zeigt, wie differenziert der Einfluss der TRL-3 stimulierten RPE-Zellen auf die Mikrogliazellen ist. Es scheint so, dass das RPE zwar eine immunologische Antwort einleitet, gleichzeitig aber versucht, die Integrität der empfindlichen neuronalen Zellen in der Retina aufrecht zu erhalten und somit einen größeren Schaden durch eine Immunreaktion der Mikrogliazellen zu verhindern. Denn eine überschießende Mikrogliaaktivierung im ZNS oder der Retina führt zur chronischen Inflammation und somit zum Untergang neuronaler Zellen (Photorezeptorzellen) [Schuetz 2004, Hanisch 2007, Langmann 2007]. Neue Erkenntnisse zeigen, dass die Mikrogliazellen im ZNS nicht nur apoptotische Zellen und Zelltrümmer phagozytieren, sondern auch lebensfähige Neurone [Brown et al. 2014]. Diese sogenannte „primäre Phagozytose“ wurde auch als „Phagoptose“ [Brown et al. 2012] bezeichnet. Zhao et al. zeigten 2015, dass die Phagozytose lebensfähiger Rezeptoraußensegmente bei angeborenen degenerativen Retinaerkrankungen eine Hauptursache für den Untergang der neuronalen Zellen sind [Zhao et al. 2015]. Es scheint so, dass eine inflammatorische Aktivierung der Mikrogliazellen zu einer Beeinträchtigung ihrer Fähigkeit führt, zwischen apoptotischen und lebensfähigen Neuronen zu unterscheiden, was zu einer vermehrten Phagoptose der Neurone während der Inflammation führt [McArthur et al. 2010]. Eine inflammatorische Aktivierung der Mikrogliazellen durch beispielsweise LPS führt zu einer Steigerung der Phagozytoseaktivität. Die Mikrogliazellen beginnen Adapterproteine zu exprimieren und vermehrt reaktive Sauerstoff- und Nitrogenverbindungen freizusetzen, welche dazu führen, dass die Neurone Phosphatidylserin exprimieren und von den Mikrogliazellen phagozytiert werden. [Neher et al. 2011, Neniskyte et al. 2011, Fricker et al. 2012]. Die Phagozytose wird durch die Bindung des Phosphatidylserins und dem MFG-E8 Adapterprotein über den Vitronektinrezeptor eingeleitet. Weiterhin hat die Phagozytose den respiratorischen Burst als Nebeneffekt. Um die über das Phagosom phagozytierten Bestandteile abzutöten und abzubauen, befinden sich im Phagosom reaktive Sauerstoffverbindungen [Minakami et al. 2006], die sowohl eine Apoptose als auch eine Nekrose hervorrufen können [Pourova et al. 2010]. Nun wird angenommen, dass die Bildung und Freilassung der reaktiven Sauerstoffverbindungen in Mikrogliazellen auch betrieben werden kann, wenn keine Phagozytose stattfindet [Bylund et al. 2010]. Getriggert wird dieser respiratorische Burst durch Hypoxie [Spranger et al. 1998], LPS [Qin et al. 2004], durch die Freilassung von reaktiven Sauerstoffverbindungen durch andere Zellen und

wahrscheinlich durch eine hohe Phagozytosereate [Wakselman et al. 2008]. Weiterhin führt der respiratorische Burst zur Freisetzung von Glutamat durch die Mikrogliazellen, was den neuronalen Zellen zusätzlich schadet [Barger et al. 2007].

Diese Punkte können eine Erklärung für die Beobachtungen sein, die in dieser Arbeit gemacht wurden. Es konnte kein aktivierender Einfluss der TLR-3 aktivierten RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen beobachtet werden, da dies in vivo fatale neurodegenerative Auswirkungen auf die retinalen Zellen hätte. Auf der anderen Seite konnte natürlich auch kein inhibierender Einfluss auf die Phagozytose beobachtet werden, da ja gerade bei einer TLR-3 Aktivierung, wie es z.B. bei einer viralen Infektion geschieht, die Mikrogliazellen als Abwehrzellen aktiv bleiben müssen.

2003 fanden Gupta et al. bei der Untersuchung der Makulae von AMD-Patienten heraus, dass die Mikrogliazellen bei der AMD ihren normalen Aufenthaltsort verlassen, in die äußere Körnerschicht wandern und eine hohe Phagozytoserate von Bestandteilen von Photorezeptorzellen besitzen. Ob sie dabei versuchen den RPE-Zellen bei der Phagozytose von abgestoßenen ROS zu helfen oder die Phagozytose selbst neurotoxisch auf eigentlich gesunde Photorezeptorzellen ist, ist momentan noch unklar. Dass die Phagozytose der Mikrogliazelle aber durchaus neurotoxisch sein kann, wurde in den Absätzen zuvor bereits beschrieben. Die Wechselwirkungen zwischen den RPE- und den Mikrogliazellen sind bis heute nicht gänzlich geklärt, scheinen aber ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der AMD zu sein. In Zukunft wird noch weiter Forschung in diesem Bereich getrieben werden müssen, nicht nur um das Krankheitsbild der AMD zu verstehen, sondern vielmehr um der Masse an Patienten helfen zu können, die durch die AMD an viel Lebensqualität einbüßen müssen.

#### **4.3. Fazit**

Obwohl in anderen Studien [Klettner et al. 2014] gezeigt wurde, dass TLR-3 stimulierte RPE-Zellen die Mikrogliazellen aktivieren, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, dass TLR-3 stimulierte RPE-Zellen die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen erhöhen oder beeinflussen. Eine erhöhte Phagozytoseaktivität von Seiten der Mikroglia kann neurotoxisch sein [Brown et al. 2010, Cunningham 2013, Kohno et al. 2013], besonders, wenn dies im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion erfolgt [Neher et al. 2011]. Das TLR-3 stimulierte RPE leitet zwar eine immunologische Antwort ein, versucht jedoch zeitgleich die Auswirkungen einer hohen Phagozytoseaktivität seitens der Mikrogliazellen, nämlich den irreversiblen Untergang neuronaler Zellen, zu verhindern. Dies kann erklären, warum in dieser Arbeit kein Einfluss der über TLR-3 stimulierten RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen gezeigt werden konnte.

## 5. Zusammenfassung

Die AMD ist die am häufigsten zur Blindheit führende Ursache in den westlichen Ländern. 2020 werden ungefähr eine Million Menschen in Deutschland von einer fortgeschrittenen AMD betroffen sein, was mit einer schweren Sehbehinderung und einem Verlust an Lebensqualität einhergeht, vergleichbar wie bei einem Schlaganfall. Für unser Gesundheitssystem werden 2020 allein für die AMD zusätzliche Mehrkosten von 3,5 Milliarden Euro entstehen. Durch den Untergang der RPE-Zellen, der Choriokapillaris und der Photorezeptorzellen entsteht zusammen mit der Bildung von Ödemen und Blutungen im Bereich der Makula der Sehverlust am Ort des schärfsten Sehens, dem Fixationspunkt. Die intravitreale Injektion eines VEGF-Hemmers ist bis heute nur für die exsudative AMD eine Therapieoption und kann den Krankheitsprozess nur verlangsamen.

Bei der Untersuchung der Makulae von AMD-Patienten konnte beobachtet werden, dass die Mikrogliazellen bei der AMD ihren normalen Aufenthaltsort verlassen, in die äußere Körnerschicht wandern und eine hohe Phagozytoserate von Bestandteilen von Photorezeptorzellen besitzen. Warum und wodurch die Mikrogliazellen zur Phagozytose angeregt werden, ist bis heute nicht gänzlich geklärt. In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass TLR-3 stimulierte RPE-Zellen im Stande sind, retinale Mikrogliazellen zu aktivieren.

In dieser Arbeit wird der Einfluss von TLR-3 stimulierten RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen untersucht. Die RPE-Zellen wurden mithilfe von Poly I:C, einer doppelsträngigen RNA, stimuliert. Die Phagozytose wurde mithilfe von fluoreszierenden Latextropfen erkennbar gemacht und sowohl mit mikroskopischen als auch mit fluorometrischen Assays gemessen. Beide Assays zeigten keinen Einfluss der TLR-3 stimulierten RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen. Auch zeigten die Mikrogliazellen keine steigende Phagozytoserate bei steigenden Konzentrationen von Poly I:C. Es ist bekannt, dass eine hohe Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen zu vermehrten neuronalen Zelluntergang führt, vor allem wenn dies unter inflammatorischen Bedingungen stattfindet. TLR-3 stimulierte RPE-Zellen sind in vitro im Stande, Mikrogliazellen zur Expression inflammatorischer Zytokine anzuregen, gleichzeitig aber auch die Expression potenziell neurodegenerativer Substanzen zu supprimieren. Es scheint so, dass TLR-3 stimulierte RPE-Zellen Mikrogliazellen in einem bestimmten Maß aktivieren können, gleichzeitig aber versuchen den Schaden, den diese Antwort auf die neuronalen Zellen haben könnte, gering zu halten. Dies könnte ein Grund dafür sein, warum in dieser Arbeit kein Einfluss der über TLR-3 stimulierten RPE-Zellen auf die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen gezeigt werden konnte.

## 6. Literaturverzeichnis

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3; *nature* 2001; 413: 732-737

Ambati J, Atkinson JP, Gelfand BD. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13: 438-451

Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, Rollins BJ, Ambati BK. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat. Med.* 2003; 9: 1390-1397

Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, Chapin EA, Johnson PT, Curletti CR, Hancox LS, Hu J, Ebright JN, Malek G, Hauser MA, Rickman CB, Bok, D, Hageman GS, Johnson LV. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis revisited. *Prog. Retin. Eye Res.* 2010; 29: 95-112

Anderson DH, Mullins R, Hageman G, Johnson LV. A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am J Ophthalmol.* 2002; 134:411–31.

Arnold,J: Age related macular degeneration. *Clin Evid*, 2005; 2005(13):762-775

Barger SW, Goodwin ME, Porter MM, Beggs ML. Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *J. Neurochem.* 2007; 101: 1205-1213

Boulton M, Dayhaw-Barker P. The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond).* 2001; 15: 384-389

Bressler NM, Bressler SB, West SK et al. The grading and prevalence of macular degeneration in Chesapeake Bay watermen. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 847–852

Brown DM, Kaiser PK, Michels M et al., Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration. *N. Eng. J. Med.* 2006; 355: 1432-1444

Brown GC, Neher JJ. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014; 19: 209-216

Brown GC, Neher JJ. Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: ‘phagoptosis’. *Trends Biochem Sci* 2012; 37: 325–332

Brown GC, Neher JJ: Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol. Neurobiol.* 2010; 41: 242-247



Bylund J, Brown KL, Movitz C, Dahlgren C, Karlsson A. Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: how, where, and what for? *Free Radic. Biol. Med.* 2010; 49: 1834-1845

Campos MA, Almeida IC, Takeuchi O, Akira S, Valente EP, Procopio DO, Travassos LR, Smith JA, Golenbock DT, Gazzinelli RT, Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 2001; 167: 416-423

Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM, Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat. Neurosci.* 2006; 9: 917-924

Carwile ME, Culbert RB, Sturdivant RL, Kraft TW, Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF, and GDNF. *Exp. Eye Res.* 1998; 66: 791-805

Chen M, Xu H. Parainflammation, chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 2015; 98(5): 713-725

Chen M, Hombrebueno JR, Luo C, Penalva R, Zhao J, Colhoun L, Pandi SP, Forrester JV, Xu H. Age- and Light-Dependent Development of Localised Retinal Atrophy in CCL2(-/-) CX3CR1 (GFP/GFP) Mice. *PLoS one.* 2013; 8: e61381

Chen S, Yan H, Sun B, Zuo A, Liang D. Subretinal transfection of chitosan-loaded TLR3-siRNA for the treatment of experimental autoimmune uveitis. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013; 85: 726-35.

Chen M, Forrester JV, Xu H. Dysregulation in retinal para-inflammation and age-related retinal degeneration in CCL2 or CCR2 deficient mice. *PLoS One.* 2011; 6: e22818

Chen L, Yang P, Kijlstra A: Distribution, markers and functions of retinal microglia. *Ocular Immun. And Infl.* 2002; 10: 27-39

Chia EM, Wang JJ, Rochtchina E et al. Impact of bilateral visual impairment on health-related quality of life: the Blue Mountains Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 71-76

Clark M, Gagnon J, Williams AF, Barclay AN, MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. *EMBO* 1985; 4: 113-118

Collin M, McGovern N, Haniffa M, Human dendritic cell subsets. *Immunology* 2013; 140(1): 22-30

Combadière C, Feumi C, Raoul W et al.: CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 2920-2928

Conley YP, Thalamuthu A, Jakobsdottir J, Weeks DE, Mah T, Ferrel RE, et al.. Candidate gene analysis suggests a role for fatty acid biosynthesis and regulation of the complement system in the etiology of age-related maculopathy. *Hum. Mol. Gent.* 2005; 14:1991-2002

Cunningham C: Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia* 2013; 61: 71-90

Deetjen P, Speckmann EJ. *Physiologie*. Urban & Schwarzberg 1994, München Wien Baltimore, 2. Aufl. S 85

Deutschen Grünen Kreuz für Gesundheit (2006)

Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 2009; 28: 1-18

D'Orazio TJ, Niederkorn JY: A novel role for TGF- $\beta$  and IL-10 in the induction of immune privilege. *J. Immunol.* 1998; 160: 2089-2098

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 1992; 148: 2207-2216

Futagami Y, Sugita S, Vega J, Ishida K, Takase H, Maruyama K, Aburatani H, Mochizuki M. Role of thrombospondin-1 in T cell response to ocular pigment epithelial cells. *J. Immunol.* 2007;178:6994-7005.

Fricker M et al. MFG-E8 mediates primary phagocytosis of viable neurons during neuroinflammation. *J. Neurosci.* 2012; 32: 2657-2666

Gehrig A, Langmann T, Horling F, Janssen A, Bonin M, Walter M, Poths S, Weber BH, Genome-wide expression profiling of the retinoschisin-deficient retina in early postnatal mouse development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48: 891-900

Gregerson DS, Heuss ND, Lew KL, McPherson SW, Ferrington DA. Interaction of retinal pigmented epithelial cells and CD4 T cells leads to T-cell anergy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007; 48: 4654-63.

Grehn F, *Augenheilkunde* (2012) Springerverlag, Heidelberg 31. Auflage S. 44, 255-206

Gu X, Meier SG, Miyagi M, Rayborn ME, Hollyfield JG, Crabb JW, Salomon RG, Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 42027-42035

Gupta N, Brown KE, Milam AH. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2003; 76: 463–471

Haines JL, Schnetz-Boutaud N, Schmidt S, Scott WK, Agarwal A, Postel EA, et al.. Functional candidate genes in age-related macular degeneration: significant association with VEGF, VLDLR and LRP6. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006; 47: 329-335

Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, Bird AC, Gilbert CE, Spector TD. Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study. *Ophthalmology* 2002; 190: 730-736

Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002; 40: 140-155

Hanisch UK, Kettenmann H, Microglia; active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. NeuroSci.* 2007; 10: 1387-1394

Harada C, Harada T, Quah HM, Maekawa F, Yoshida K, Ohno S, Wada K, Parada LF, Tanaka K, Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience* 2003; 122: 229-235

Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D, The P2Y<sub>12</sub> receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat. Neurosci.* 2006; 9: 1512-1519

Heier JS, Shapiro H, Singh AA. Randomized, Controlled Phase III Study of Ranibizumab (Lucentis<sup>TM</sup>) for Minimally Classic or Occult Neovascular Age-Related Macular Degeneration: Two-Year Efficacy Results of the MARINA Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: E-Abstract 2959.

Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik JF, Kaiser PK, Nguyen QD, Kirchhof B, Ho A, Ogura Y, Yancopoulos GD, Stahl N, Vitti R, Berliner AJ, Soo Y, Anderesi M, Groetzsch G, Sommerauer B, Sandbrink R, Intravitreal Aflibercept (VEGF Trap-Eye) in Wet Age-related Macular Degeneration. American Academy of Ophthalmology Annual Meeting, October 22-25, 2011

Hjelmeland LM, Cristofalo VJ, Funk W, Rakoczy E, Katz ML. Senescence of the retinal pigment epithelium. *Mol. Vis.* 1999; 5: 33

Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD, Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX-2 (CD200). *Science* 2000; 290: 1768-1771

Hughes MM, Field RH, Perry VH, Murray CL, Cunningham C: Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads and of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrPSc, even upon LPS stimulation. *Glia* 2010; 58: 2017-2030

Imai Y, Kohsaka S, Intracellular Signaling in M-CSF-Induced Microglia Activation: Role of Iba-1. *Glia* 2002; 40: 164-174

Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein Iba1. *Brain Res Mol Brain* 1998; 57:1-9

Jager RD, Mieler WF, and Miller JW. Age-Related Macular Degeneration *N Engl J Med* 2008; 358:2606-17.

Heier JS, Brown DM, Chong V, Korobelnik JF, Kaiser PK, Nguyen QD, Kirchhof B, Ho A, Ogura Y, Yancopoulos GD, Stahl N, Vitti R, Berliner AJ, Soo Y, Anderesi M, Groetzsch G, Sommerauer B, Sandbrink R, Intravitreal Aflibercept (VEGF Trap-Eye) in Wet Age-related Macular Degeneration. American Academy of Ophthalmology Annual Meeting, October 22-25, 2011

Jørgensen A, Junker N, Kaestel CG, Liang Y, Wiencke A, la Cour M, Lui GM, Ødum N, Nissen MH, Röpke C. Superantigen presentation by human retinal pigment epithelial cells to T cells is dependent on CD2- CD58 and CD18-CD54 molecule interactions. *Exp. Eye Res.* 2001; 73: 723-33.

Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL, Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J. Immunol.* 2002; 168: 5233-5239

Kanski JJ *Klinische Ophthalmologie* (2008) Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München, 6. Auflage, S. 651

Klein R, Klein BEK, Linton KLP. Prevalence of age related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 1992; 99: 933–943

Klettner A, Hamann T, Schlüter K, Lucius R, Roeder J, Retinal pigment epithelium cells alter the proinflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation. *Acta Ophthalmologica* 2014; 92: 621-629

Klettner A, Koinzer S, Meyer T, Roider J, Toll-like receptor 3 activation in retinal pigment epithelium cells- Mitogen-activated protein kinase pathways of cell death and vascular endothelial growth factor secretion. *Acta Ophthalmologica* 2013, 91: 211-218

Klettner A, Möhle F, Lucius R, Roider J: Quantifying FITC-labeled latex beads opsonized with photoreceptor outer segment fragments: an easy and inexpensive method of investigating phagocytosis in retinal pigment epithelium cells. *Ophthalmic. Res.* 2011; 46: 88-91

Kohno H, Chen Y, Kevany, Pearlman E, Miyagi M, Maeda T, Palcewski K, Maeda A, Photoreceptor Proteins initiate microglial activation via Toll-like Receptor-4 in retinal degeneration Mediathek by all-Trans-retinal. *Journal of biological chemistry* 2013; 21: 15326-15341

Kumar MV, Chandrasekharam N. Nagineni, Marian S. Chin, John J. Hooks, Barbara Detrick, Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells, *Journal of Neuroimmunology* 2004; 153: 7-15

Langmann T: Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81: 1345-1351

Leibowitz H, Krueger DE, Maunder LR et al. The Framingham Eye Study Monograph. An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults. *Surv Ophthalmol* 1980; 24: 335–610

Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron.* 2009; 64(1); 110-122

Lüllmann-Rauch *Histologie* (2009) Thieme, Stuttgart New York, 3. Auflage S. 185/186, S. 588/589

Marmor MF, Wolfensberger TW, eds. The retinal pigment epithelium. Current aspects of function and disease. New York: Oxford University Press; 1998.

Marmor MF *Retinal Pigment Epithelium*, medtextfree in *Ophthalmology*, 2010

Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptotic regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl, *J. Exp. Med.* 1995; 182: 1545-1556

Masche UP. Altersbedingte Makuladegeneration (2006), pharma- kritik, Will

McArthur et al. Annexin A1: a central player in the anti-inflammatory and neuroprotective role of microglia. *J. Immunol.* 2010; 185: 6317-6328

McCaughan GW, Clark MJ, Barclay AN, Characterization of the human homolog of the rat MRC OX-2 membrane glycoprotein. *Immunogenetics* 1987; 25: 329-335

Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008; 454: 428-435

Medzhitov R, Janeway Jr., CA, Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997; 91: 295-298

Meyers SM, Greene T, Gutman FA. A twin study of age-related macular degeneration. *Am J. Ophthalmol.* 1995; 120: 757-766

Minakami R, Sumimoto H. Phagocytosis-coupled activation of the superoxide-producing phagocyte oxidase, a member of the NADPH oxidase (nox) family. *Int. J. Hematol.* 2006; 84: 193-198

Nathan C, Muller WA, Putting the brakes on innate immunity: a regulatory role for CD200? *Nat. Immunol.* 2001; 2: 17-19

Neher JJ, Neniskyte U, Zhao JW, Bal-Price A, Tolkovsky AM, Brown GC: Inhibiting of microglial phagocytosis is sufficient to prevent inflammatory neuronal death. *J. Immunol.* 2011; 186: 4973-4983

Neniskyte U et al. Neuronal death induced by nanomolar amyloid beta is mediated by primary phagocytosis of neurons by microglia. *J. Biol. Chem.* 2011; 286: 39904-39913

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F: Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 2005; 308: 1314-1318

Opitz B, Schroder NW, Spreitzer I, Michelsen KS, Kirschning CJ, Hallatschek W, Zahringer U, Hartung T, Gobel UB, Schumann RR, Toll-like receptor-2 mediates *Treponema* glycolipid and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 22041-22047

Paglinawan R, Malipiero U, Schlapbach R, Frei K, Reith W, Fontana A, TGFβ directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. *Glia* 2003; 44: 219-231

Pourova J, Kottova M, Voprsalova M, Pour M. Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes. *Acta Physiol. (Oxf.)* 2010; 198: 15-35

Patel N, Ohbayashi M, Nugent AK, Ramchand K, Toda M, Chau KY, Bunce C, Webster A, Bird AC, Ono SJ, Chong V, Circulating anti-retinal antibodies as immune markers in age-related macular degeneration. *Immunology* 2005; 115: 422-430

Penfold PL, Liew SC, Madigan MC, Provis JM. Modulation of major histocompatibility complex class II expression in retinas with age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997; 38: 2125-2133

Penfold PL, Killingsworth MC, Sarks SH. Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1985; 223: 69-76

Percopo CM, Hooks JJ, Shinohara T, Caspi R, Detrick B. Cytokine-mediated activation of a neuronal retinal resident cell provokes antigen presentation. *J. Immunol.* 1990;145:4101-7.

Qin L, Liu Y, Wang T, Wei SJ, Block M, Wilson B et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 1415-1421

Raivich G, Bluethmann H, Kreutzberg GW, Signaling molecules and neuroglial activation in the injured central nervous system. *Keio J Med* 1996; 45: 239-247

Ramrattan RS, van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, Mulder PG, de Jong PT. Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994; 35: 2857-2864

Raoul W, Feumi C, Kellder N, Lavalette S, Houssier M, Behar-Cohen F, Combadiere C, Sennlaub F: Lipid-bloated subretinal microglial cells are the origin of drusen appearance in CX3CR1-deficient mice. *Ophthalmic. Res.* 2008; 40: 115-119

Raoul W, Keller N, Roderio M, Behar-Cohen F, Sennlaub F, Combadiere C, Role of the chemokine receptor CX3CR1 in the mobilization of phagocytic retinal microglia cells. *J. Neuroimmunol.* 2008; 198:56-61

Richardson A, Hao C, Fedoroff S. Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 1993; 7 (1): 25-33

Rosenfeld PJ, Moshfeghi AA, Puliafito CA, Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging*. 2005; 36:331-335

Schuetz E, Thanos S, Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Curr. Drug Targets* 2004; 5: 619-627

Schultz D, Klein M, Humpert A, Luzier C, Persun V, Schain M, et al.. Analysis of the ARMD1 locus: Evidence that a mutation in HEMICENTIN-1 is associated with age-related macular degeneration in a large family. *Hum. Mol. Genet*. 2003; 12: 3315-3323

Schrader WF. Altersbedingte Makuladegeneration: Sozioökonomische Zeitbombe in der alternden Gesellschaft. *Ophthalmologe* 2006; 103: 742-748

Seddon J, Ajani U, Mitchell B. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J. Ophthalmol*. 1997; 123: 199-206

Smith ME, Phagocytosis of myelin in demyelinating disease: a review. *Neurochem. Res*. 1999; 24(2): 261-268

Sparrow JR, Boulton M, RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye Res*. 2008; 80: 595-606

Spranger M, Kiprianova I, Krempien S, Schwab S. Reoxygenation increases the release of reactive oxygen intermediates in murine microglia. *J. Cereb. Blood Flow Meta*. 1998; 18: 670-674

Streit WJ. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS; *Glia* 2002; 40: 133-139

Streit WJ, Hurley SD, McGraw TS, Semple-Rowland SL. Comparative evaluation of cytokine profiles and reactive gliosis supports a critical role for interleukin-6 in neuron-glia signaling during regeneration. *J Neurosci Res* 2000; 61:10-20

Sugita S, Futagami Y, Smith SB, Naggar H, Mochizuki M. Retinal and ciliary body pigment epithelium suppress activation of T lymphocytes via transforming growth factor beta. *Exp. Eye Res*. 2006; 83: 1459-71.

Sun JK, Miller JW. Medical treatment of choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol Clin*. 2005; 45(4):115-32.



- Sun D, Enzmann V, Lei S, Sun SL, Kaplan HJ, Shao H. Retinal pigment epithelial cells activate uveitogenic T cells when they express high levels of MHC class II molecules, but inhibit T cell activation when they express restricted levels. *J. Neuroimmunol.* 2003; 144: 1-8.
- Takahashi K, Rochford CD, Neumann H: Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *J. Exp. Med.* 2005; 201: 647-657
- Tuo J, Grob S, Zhang K, Chan CC. Genetics of immunological and inflammatory components in age-related macular degeneration. *Ocul Immunol Inflamm.* 2012; 20(1): 27-36.
- Ufret-Vincenty RL, Aredo B, Liu X, McMahon A, Chen PW, Sun H, Niederkorn JY, Kedzierski W. Transgenic mice expression variants of complement factor H develop AMD-like retinal findings. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51: 5878-5887
- van Rossum D, Hanisch UK, Microglia. *Metab. Brain Dis.* 2004; 19: 393-411
- Veerhuis R, Nielsen HM, Tenner AJ, Complement in the brain. *Mol. Immunol* 2011; 48(14): 1592-1603
- Vingerling JR, Dielemans I, Hofman A et al. The prevalence of age-related maculopathy in the Rotterdam Study. *Ophthalmology* 1995; 102: 205–210
- Wakselman S, Bechade C, Roumier A, Bernard D, Triller A, Bessis A. Developmental neuronal death in hippocampus requires the microglial CD11b integrin and DAP12 immunoreceptor. *J. Neurosci.* 2008; 28: 8138-8143
- Wiencke AK, Kiilgaard JF, Nicolini J, Bundgaard M, Röpke C, La Cour M. Growth of cultured porcine retinal pigment epithelial cells. *Acta Ophthalmol. Scand.* 2003; 81(2): 170-176
- Willermain F, Caspers-Velu L, Nowak B, Stordeur P, Mosselmans R, Salmon I, Velu T, Bruyns C. Retinal pigment epithelial cells phagocytosis of T lymphocytes: possible implication in the immune privilege of the eye. *Br. J. Ophthalmol.* 2002; 86: 1417-21.
- Wright GJ, Puklavec MJ, Willis AC, Hoek RM, Sedgwick JD, Brown MH, Barclay AN. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity* 2000; 13: 233-242

- Wu Z, Zhang J, Nakanishi H. Leptomeningeal cells activate microglia and astrocytes to induce IL-10 Production by releasing pro-inflammatory cytokines during systemic inflammation. *J. Neuroimmunol.* 2005; 167:90-98
- Xu H, Chen M, Forrester JV, Para-inflammation in the aging retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 2009; 28: 348-368
- Xu H, Chen M, Manivannan A, Lois N, Forrester JV, Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* 2008; 7: 58-68
- Zeiss CJ, Johnson EA, Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004; 45: 971-976
- Zeng H., Zhu X., Zhang C., Yang L., Wu L., Tso. M. Identification of Sequential Events and Factors associated with microglial activation, migration and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46: 2992-2999
- Zhao L, Zabel MK, Wang X, Ma W, Shah P, Fariss RN, Qian H, Parkhurst CN, Gan WB, Wong WT. Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *Embo Mol. Med.* 2015; 7 (9): 1179-1197
- Zinn K, Marmor MF, eds. *The retinal pigment epithelium.* Cambridge: Harvard University Press; 1979

## **7. Danksagung**

Prof. Dr. med. Roider möchte ich für die Möglichkeit danken, die Doktorarbeit in der Augenklinik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchzuführen,

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor Dr. rer. nat. Klettner für ihre Unterstützung und Betreuung. Nicht nur bei der praktischen Durchführung der verschiedenen Experimente sondern auch beim Verfassen dieser Arbeit stand sie stets mit Rat und Zeit zur Seite. Durch ihr Engagement wurde mir ermöglicht, einen Einblick in das experimentelle Arbeiten zu gewinnen.

Herrn Dr. Böhm und dem pharmakologischen Insitut des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Kiel möchte ich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit danken.

Prof. Dr. med Lucius und dem anatomischen Instituts der Christian-Albrechts Universität in Kiel möchte ich für die freundschaftliche Kooperation danken.

Ein herzlicher Dank gilt Claudia Cüppers und Elisabeth Richert für ihre tatkräftig Unterstützung im Labor und vor allem der Pflege der RPE- und Mikrogliazellkultur.

Meinen Mitdoktoranden und Mitdoktorandinnen danke ich für das tolle Arbeitsklima.

Meinem Freund danke ich für seine Geduld.

## 8. Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Karen Schlüter  
Adresse: Gut Insel 6  
48151 Münster  
Mobil: 0160 92 74 50 75  
Email: karenschlueter@gmx.net  
Geburtsort: Vechta  
Geburtsdatum: 13.04.1990  
Familienstand: ledig

### Ausbildung/beruflicher Werdegang

---

Seit Nov 2016	Assistenzärztin für Ophthalmologie bei den Augenärzten am St. Franziskus Hospital in Münster, NRW
2009 - 2016	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel
2011	<b>1. Staatsexamen</b> mit Note sehr gut bestanden
2012	Beginn der <b>Dissertation</b> zur Altersbedingten Makuladegeneration „Einfluss TLR-3 stimulierter retinaler Pigmentepithelzellen auf die Phagozytoseaktivität retinaler Mikrogliazellen“
2015	<b>2. Staatsexamen</b> mit Note gut bestanden
2015	Beginn des <b>Praktischen Jahres</b>  1. Tertial: Innere Medizin in der Imland Klinik in Eckernförde 2. Tertial: Chirurgie im Kantonsspital Sursee in der Schweiz 3. Tertial: Augenheilkunde im UKSH Campus Kiel
2016	<b>3. Staatsexamen</b> mit Note sehr gut bestanden
2002 – 2009	schulischer Werdegang mit einem <b>Abiturabschluss</b> von 1,2 am Gymnasium in Damme im Landkreis Vechta in Niedersachsen

## 9. Publikation/Kongressbeiträge

**Veröffentlichung** des Papers als Koautor “Retinal pigment epithelium cells alter the proinflammatory response of retinal microglia to TLR-3 stimulation” Alexa Klettner, Timothy Hamann, Karen Schlüter, Ralph Lucius und Johann Roider in der **Acta Ophthalmologica** (siehe nächste Seite)

**ARVO Annual Meeting, Life-Changing Research, Seattle, Washington, May 5-9, 2013 Klettner A, Hamann T, Wilker S, Berg C, Schlüter K, Lucius R, Mentlein R, Roider J.** „Differential effects of TLR-3 activated RPE on retinal microglia and blood-derived monocytes“ Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.. 2013; 54(15):4519.